Untersuchungen zur Rolle der Cadmium-stimulierten Lipidperoxidation in der Cadmium-Giftigkeit in isolierten Leberparenchymzellen der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Diplom-Biologe
LUDWIG MÜLLER
aus Düsseldorf

Düsseldorf 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0040

Untersuchungen zur Rolle der Cadmium-stimulierten Lipidperoxidation in der Cadmium-Giftigkeit in isolierten Leberparenchymzellen der Ratte

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Biologe
LUDWIG MÜLLER
aus Düsseldorf

Düsseldorf 1983

Referent: Prof.Dr. F.K. Ohnesorge
Korreferent: Prof.Dr. M. Grieshaber

Tag der mündlichen Prüfung: 28.November 1983

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Abkürzungen	1
2.	Einleitung	2
3.	Material und Methoden	12
3.1	Chemikalien und Enzyme	12
3.2	Behandlung der Tiere	13
3.3	Isolierung von Leberparenchymzellen	13
3.4	Inkubationen	16
3.4.1	Inkubationsbedingungen	16
3.4.2	Randbedingungen	17
3.5	Parameter der strukturellen Intaktheit der Hepatocyten	18
3.5.1	Bestimmung der Trypan-Blau-Anfärbbarkeit	18
3.5.2	Bestimmung der NADH-Oxidation	18
3.5.3	Bestimmung der Digitonin-induzierten ANS-Fluoreszenz	18
3.5.4	Zentrifugal-Filtration und Sedimentation	19
3.5.5	Bestimmung der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27)	20
3.5.6	Bestimmung des Nitrophenylphosphat (NPP)-Umsatzes	20
3.6	Bestimmung der Protein-Konzentration	22
3.7	Parameter der funktionellen Intaktheit der Hepatocyten	22
3.7.1	Bestimmung von ATP, ADP und AMP	22
3.7.2	Bestimmung von NADPH und $NADP^+$	22
3.7.3	Bestimmung von Lactat und Pyruvat	23
3.7.4	Bestimmung des O_2-Verbrauchs	23
3.8	Bestimmung der Lipidperoxidation	23
3.9	Bestimmung von SH-Gruppen und GSH	23

3.10	Bestimmung der Enzymaktivitäten	24
3.10.1	Bestimmung der Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) und der Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2)	24
3.10.2	Bestimmung der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH, EC 1.1.1.42) und des Malat Enzyms (EC 1.1.1.39)	24
3.11	Fraktionierung der Hepatocyten	25
3.12	Isolierung der Mitochondrien	25
3.13	Bestimmung der Cd-Aufnahme und des Cd-Gehalts	25
3.14	Bezugswerte	26
3.15	Meßwerterfassung und Signifikanz	26
4.	Ergebnisse und Diskussion	28
4.1	Aufnahme von Cadmium in Hepatocyten gehungerter Ratten	28
4.2	Eignung von Parametern struktureller Intaktheit zur quantitativen Beschreibung Cadmium-bedingter Änderungen der Zellmembranpermeabilität in Hepatocyten gehungerter Ratten	31
4.3	Vergleich der Empfindlichkeit von Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten gegenüber Cadmium an Hand der Parameter TB-Anfärbbarkeit, SH-Gruppen und Bildung TBA-reaktiven Materials	37
4.4	Untersuchungen zum Zusammenhang der Ereignisse TB-Anfärbbarkeitszunahme, Bildung TBA-reaktiven Materials und Abnahme der SH-Gruppen in Cadmium-vergifteten Hepatocyten gehungerter Ratten	43
4.5	Bedeutung der Cadmium-abhängigen Lipidperoxidation in der Cadmium-bedingten Beeinträchtigung intrazellulärer Prozesse in Hepatocyten gehungerter Ratten	51
4.5.1.	Verteilung von Cadmium in den Zellkompartimenten	51

4.5.2. Einfluß von Cadmium auf das Glutathion-Peroxidase-System in Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten und dessen Beziehung zur Lipidperoxidation 54

4.5.3 Einfluß von Cadmium auf den Energie-Status, den O_2-Verbrauch und den Lactat-Pyruvat-Quotienten in Hepatocyten gehungerter Ratten; Beziehung zur Lipidperoxidation 63

4.5.4 Einfluß von Cadmium auf Struktur und Funktion isolierter Mitochondrien und dessen Beziehung zur Lipidperoxidation 75

4.5.5 Interaktion von Cadmium mit essentiellen Metallen in isolierten Hepatocyten; Einfluß auf die Cadmium-bedingte Lipidperoxidation 89

5. Abschließende Betrachtung 94

6. Zusammenfassung 99

7. Literaturverzeichnis 101

1. Abkürzungen

ADP	Adenosin-diphosphat
AMP	Adenosin-monophosphat
ANS	8-Anilino-Naphthalin-Sulfonsäure-1
ATP	Adenosin-triphosphat
Ca	Ca^{2+}, Calzium
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
Cd	Cd^{2+}, Cadmium
DNP	2,4-Dinitrophenol
DOC	Desoxycholsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glutathion-Reduktase, GSSG-Reduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
GSSG	Glutathion, oxidiert
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPO	Lipidperoxidation
Mn	Mn^{2+}, Mangan
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduziert
NP	Nitrophenol
NPP	Nitrophenylphosphat
RuR	Ruthenium Rot
TB	Trypan Blau
TBA-RM	Thiobarbitursäure-reaktives Material
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Zn	Zn^{2+}, Zink

Konzentrationen:

µM	µmole/l
mM	mmole/l

2. Einleitung

Industrielle Prozesse bilden die hauptsächliche Kontaminationsquelle der Umwelt mit dem Schwermetall Cadmium (Cd) (1). Es wird insbesondere bei der Verarbeitung von Zn-Erzen (als Begleitmetall), aber auch bei der Blei-Verhüttung, Stahl- und Eisenschmelze freigesetzt. Verbrennen industriellen Mülles sowie fossiler Brennstoffe wie Kohle, Öl und Gas führen zu zusätzlichen Belastungen der Umwelt mit diesem Metall (2). Exponiert, und somit einem erhöhten Risiko der Cd-Vergiftung ausgesetzt, sind vor allem Industriearbeiter (1-3); die Anreicherung des Metalls in Bioorganismen (4) und letzlich in der Nahrungskette bedeutet jedoch auch für breite Bevölkerungskreise eine zunehmend ernste Gefahr der Vergiftung durch aufgenommenes Cd (5).

Die Gegenwartsliteratur befaßt sich vornehmlich mit der chronischen Giftigkeit von subletalen Cd-Konzentrationen z.B in der Lunge (3) und Niere (Übersichten: 6-8).
Die Leber hingegen ist ein Zielorgan der akuten Cd-Giftigkeit (9). Etwa 50-70% der vom Körper nach einmaliger Gabe aufgenommenen Metall-Dosis gelangt in dieses Organ (6,7). Erst nach längerer Cd-Exposition treten infolge der Umverteilung des gespeicherten Cd im Körper Schäden in anderen Organen wie z.B. der Niere auf (6,8). Obwohl Leberschäden in Form von Parenchymzell-Nekrosen, einhergehend mit degenerativen Veränderungen der Mitochondrien und Dilatation des Endoplasmatischen Retikulums, frühzeitig nach Cd-Gabe histologisch erfaßt werden können (10,11), ist die akute Giftigkeit von Cd auf die Leber bislang wenig untersucht (10-12).

Zur näheren Charakterisierung der akuten Wirkung von Cd auf die Leber ist das System der isolierten Leberparenchymzelle geeignet, insbesondere da das Metall vornehmlich von diesen Zellen des Lebergewebes aufgenommen wird (13). Dieses System vereint zudem die Vorteile des in-vivo Tierexperiments, des Modells der perfundierten Leber und desjenigen isolierter Organellen hinsichtlich seiner Komplexizität, des Beibehaltens der Zellkompartimentierung und der Übersichtlichkeit.

Obwohl die Cd-Giftigkeit in zahlreichen verschiedenen Zellsystemen untersucht worden ist (14-19), hat bislang keine Studie zu einer schlüssigen Erklärung der Cd-bedingten Zellschädigung geführt.

Die Lebensfähigkeit der Zelle basiert auf ihrer strukturellen Intaktheit, d.h. der Integrität zellulärer Membranen, und ihrer funktionellen Unversehrtheit, d.h. der Funktionsfähigkeit des Zellmetabolismus (20-22). Die durch Cd herbeigeführte Schädigung der Zelle -die letzlich zum Zelltod führt- kann auf einer Vielzahl von Einflüssen des Metalls auf die strukturelle und funktionelle Intaktheit der Zelle beruhen (7,8,23).

Abb.1 faßt einige der heutzutage diskutierten Mechanismen der Cd-bedingten Zellschädigung zusammen. Die Beeinträchtigung der Zellmembran-Integrität (als Eingriff in die strukturelle Intaktheit) wird von einigen Autoren als initialer Schritt der Schwermetall-Giftigkeit angenommen (23-27). Hierfür sprechen u.a. Befunde über die Cd-Wirkung auf künstliche Phospholipid-Membranen (7,24). Abb.1 zeigt weiter, daß Cd auch mit Molekülen reagieren kann, die , wie Cystein, Glutathion (GSH) und SH-Enzyme, reaktive SH-(Thiol)-Gruppen besitzen (23,27-30, Übersichten 31,32). Hierdurch können einerseits Membranstrukturen verändert, andererseits kann die metabolische Leistungsfähigkeit der Zelle (d.h. ihre funktionelle Intaktheit) gestört werden (27). Vermehrte Membranpermeabilisierung und schließlich Zelluntergang sind die Folgen.

Als möglicherweise grundlegender Mechanismus der toxischen Wirkung von Fremdstoffen wird seit einigen Jahren die Stimulation der Lipidperoxidation (LPO) diskutiert (Übersichten: 32-34). Lipidperoxide sind das Ergebnis der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zellulärer Membranen (Abb.2). Sie können in Form ihrer Zerfallsprodukte (Alkane, Radikale, Malondialdehyde) quantitativ bestimmt werden (33). Die Akkumulation von Lipidperoxiden wird wegen ihrer potentiell schädigenden Wirkung auf Membranen und Enzyme als nicht vereinbar mit dem Leben der Zelle angesehen (32-38).

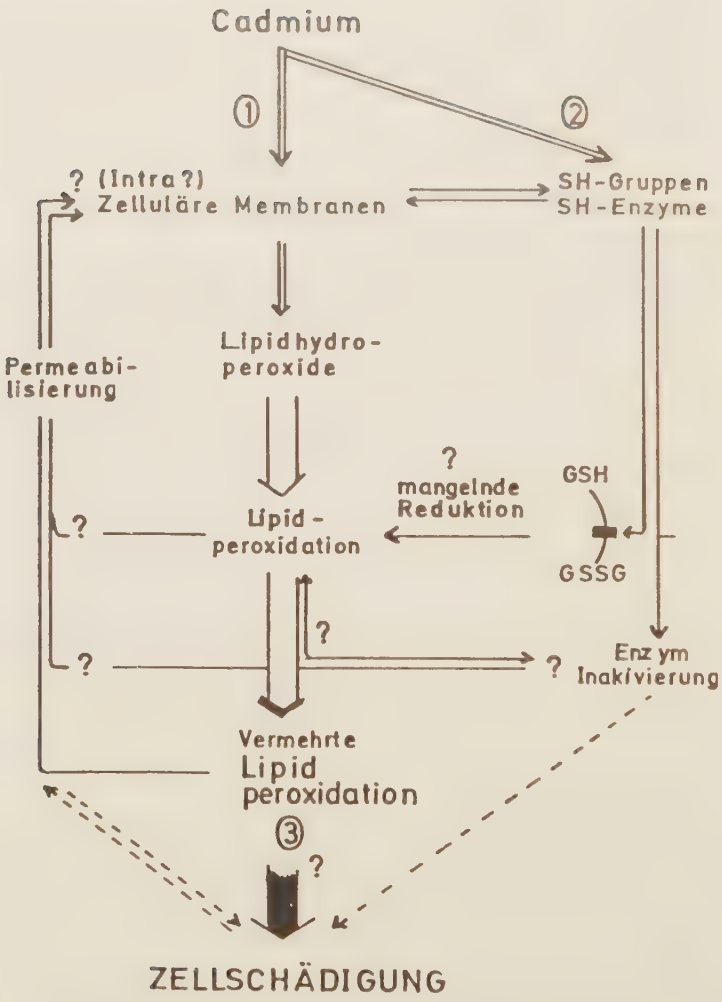


Abb.1: Mechanismen der Zellschädigung durch Cadmium

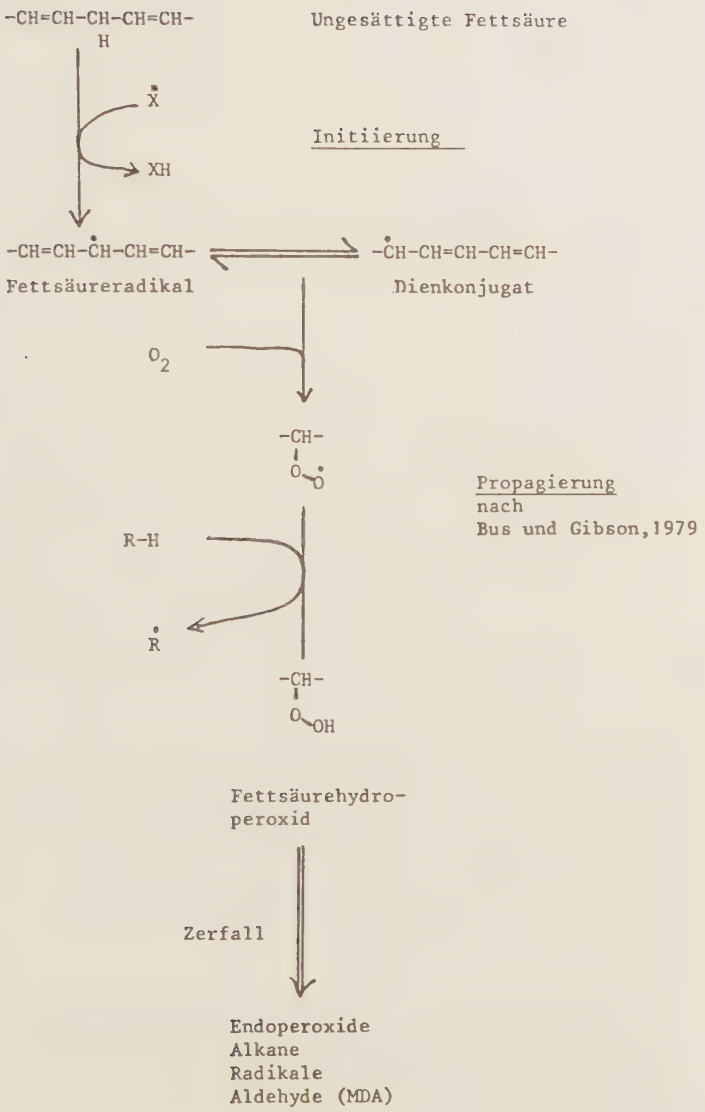


Abb.2: Möglicher Ablauf der Lipidperoxidation

MDA (Malondialdehyde) können als Thiobarbitursäure-reaktives Material (TBA-RM) bestimmt werden

Seit 1978 ist bekannt, daß das Schwermetall Cd auch Lipidperoxidation in Niere und Testis stimuliert (35). Das gleichzeitige Auftreten nekrotischer Veränderungen in diesen Geweben (40) hat zu der Annahme geführt, daß die zellschädigende Wirkung des Metalls mit seiner LPO-stimulierenden Eigenschaft in Verbindung steht (35,40). Zwar konnte auch in isolierten Leberparenchymzellen der gefütterten Ratte die Stimulation der LPO durch Metalle nachgewiesen werden, ein Zusammenhang mit der in Gegenwart von Cd beobachteten Membranpermeabilitätserhöhung (für Aspartat-Amino-Transferase oder K^+) ist jedoch für dieses System bezweifelt worden (18,41-43). Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Cd-bedingte Akkumulation von Lipidperoxiden per se unschädlich für die Zelle ist.

Zu toxikologischen Untersuchungen werden -wegen der leichteren Isolationsmöglichkeit- hauptsächlich Hepatocyten gefütterter Tiere herangezogen (18,20-22,36,37,39,41-46). Der Hungerzustand sensibilisiert jedoch die Zelle im allgemeinen gegenüber Zellgiften verschiedenster Art (6,8,47-50). Mangels entsprechender Untersuchungen ist bislang unbekannt, ob und in welchem Maße Cd überhaupt LPO in Hepatocyten gehungerter Ratten hervorruft. Es ist daher auch unklar, ob unter diesen speziellen Bedingungen der Cd-abhängigen LPO eine bedeutendere Rolle, d.h. eine ursächliche Verantwortlichkeit, in der Cd-Giftigkeit zukommt.

Die Schädigung der Zellen wird häufig mit der Zellmembranschädigung (erkennbar z.B. am Verlust zellulärer Enzyme ins umgebende Medium) gleichgesetzt (18,36,37,39,41-46). Bevor es zu einer feststellbaren Änderung der Permeabilitätseigenschaft der Membran kommt, werden jedoch in der Regel funktionelle Prozesse durch toxische Agenzien betroffen (21,22).

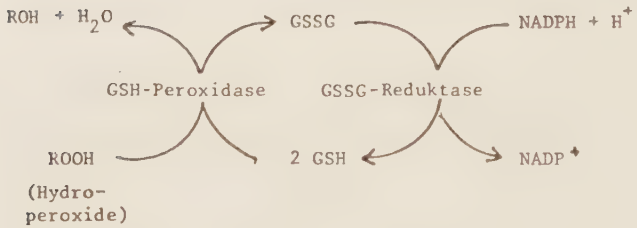
Ein Parameter metabolischer Leistungsfähigkeit der Hepatocyten ist der zelluläre GSH-Gehalt (32,36-39,46,51). Als Bestandteil des Glutathion-Peroxidase-Systems (s.u.; Abb.3) kann GSH u.a. die Akkumulation von zellschädigenden Lipidperoxiden verhindern (32, 37,38,46).

Das vermehrte Auftreten von Lipidperoxidationsprodukten (nach Diethylmaleat- oder Jodacetamid-Behandlung) wird von einigen Autoren auf die Erschöpfung des zellulären GSH-Gehalts zurückgeführt (37,38). Lipidperoxidation, wie sie z.B. durch Chloroform ($CHCl_3$) hervorgerufen wird, soll andererseits selbst zur Herabsetzung des GSH-Gehalts und zur Zellmembranschädigung führen (36,39).
Unklar ist, in welcher Weise Cd in das Zellgeschehen eingreift, d.h. ob ein Zusammenhang zwischen der Cd-stimulierten Lipidperoxidation und den Cd-bedingten Änderungen der Membranpermeabilität und des GSH-Gehalts in Hepatocyten (gehungerter Ratten) besteht.

Denkbar wäre ein Einfluß von Cd auf das Glutathion-Peroxidase-System (Abb.3). In dieses System sind die Enzyme Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) und Glutathion-Reduktase (GSSG-Reduktase) sowie das NADPH-generierende Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) eingebunden (32,34), die in der in Abb.3 veranschaulichten Weise zur Reduktion von Lipidperoxiden unter Oxidation des Glutathions zu GSSG und erneuter NADPH-abhängiger Reduktion des GSSG zu Glutathion führen.

Es ist angenommen worden, daß die Stimulation der LPO auf einem verminderten Lipidperoxidabbau nach Hemmung der GSH-Px beruhen könnte (37,40). Da die GSH-Px auch ein Zielmolekül für Metalle darstellt (40), könnte eine Cd-bedingte Hemmung dieses Enzyms die in Gegenwart des Metalls stimulierte LPO erklären. Die LPO wäre dann Ausdruck der Cd-bedingten Schädigung der funktionellen Integrität der Zelle. Untersuchungen an nicht zellulären (Homogenate, isoliertes Enzym) und in-vivo Systemen haben bisher Befunde ergeben, die sowohl für (40,53) als auch gegen einen Hemmeffekt des Metalls sprechen (54,55). Es ist ungeklärt, welchen Einfluß Cd auf das Enzym in isolierten Hepatocyten ausübt. Untersuchungen dieser Cd-Wirkung sind jedoch -in Hinblick auf die LPO-Stimulation und deren vermeintlicher Folgen- erforderlich. Von Bedeutung ist ebenfalls die Funktionsfähigkeit der GSSG-Reduktase und der G6PDH, letzlich als Lieferanten des Cosubstrats GSH im GSH-Px-System (Abb.3). Beide Enzyme enthalten SH-Gruppen, die

A. GSH-Metabolismus in Gegenwart von GSH-Px und GSSG-Reduktase



(nach Sies et al. 1978)

B. NADPH-generierende Enzym-Systeme

1. Glucose-6-Phosphat → 6-Phosphogluconat
   ($NADP^+$, G6PDH, NADPH)

2. Isocitrat → α-Ketoglutarat, CO_2
   ($NADP^+$, ICDH, NADPH)

3. Malat → Pyruvat, CO_2
   ($NADP^+$, Malat Enzym, NADPH)

Abb.3: Abbau von Lipidperoxiden und GSH- und NADPH-Bedarf im Glutathion-Peroxidase-System

sie potentiell gegenüber Cd empfindlich machen (23,28,30,31). In-vivo Untersuchungen (28) sowie Studien in zellfreien Systemen (29) weisen auf eine metall-bedingte Aktivitätsminderung dieser Enzyme hin. Der in der Literatur noch nicht erbrachte Nachweis eines Hemmeffektes von Cd auf diese Enzyme in isolierten Hepatocyten könnte Aufschluß über die Ursachen der Cd-bedingten LPO einerseits und über die Cd-Wirkung auf den zellulären GSH-Gehalt andererseits geben.

Zur funktionellen Integrität der Zelle zählt insbesondere die Aufrechterhaltung der Funktionstüchtigkeit mitochondrialer Prozesse, die letzlich das Beibehalten der strukturellen Intaktheit, d.h. der Zellmembran-Integrität, gewährleistet (7,8,20,21,27). Cd kann bereits in geringen Konzentrationen die oxidative Phosphorylierung in-vivo (56-58,61) und in isolierten Mitochondrien (7,59-61) hemmen. Dennoch ist der schädigende Einfluß von Cd auf den Energie-Status der Zelle bislang vernachlässigt worden (16). Die Mitochondrienmembran ist zudem -im Gegensatz zur Zellmembran- reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (33,62), die peroxidiert werden können (Abb.2). Die in isolierten Mitochondrien durch verschiedenste Agenzien ausgelöste Lipidperoxidation (63; Obersicht:64) soll für strukturelle (im Endeffekt funktionelle) Schädigungen dieser Organellen verantwortlich sein (63-65). Untersuchungen über einen diesbezüglichen Effekt von Cd liegen zur Zeit nicht vor. Eine metall-bedingte Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion könnte jedoch Basis der Cd-bedingten Zellschädigung sein. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Cd-abhängiger LPO und zellulärem Energie-Status sowie strukturellen Veränderungen der Mitochondrien sollte zur weiteren Klärung der Bedeutung der Lipidperoxidation als Ursache oder Folge der Cd-Vergiftung beitragen.

Die schädigende Wirkung von Cd kann in-vitro (Mitochondrien) und in-vivo durch die Gabe essentieller Metalle wie Mangan (59, 65), insbedondere jedoch durch das dem Cd ähnliche Metall Zink vermindert oder sogar aufgehoben werden (43,66-68). Der Schutzeffekt des Zn wird u.a. seiner membranstabilisierenden Eigenschaft zugeschrieben (66). Ebenfalls stabilisierend soll

das Calzium wirken (7). Der Einfluß dieser Metalle auf die Cd-bedingte LPO und Zellschädigung isolierter Hepatocyten gehungerter Ratten ist jedoch bislang noch nicht untersucht worden. Dies erscheint aber erforderlich, um einen näheren Einblick in die Rolle der Lipidperoxidation im Wirkungsspektrum des Cd zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der Lipidperoxidation in der Cd-Giftigkeit in Hepatocyten 18h gehungerter Ratten untersucht.
Zunächst soll der Fragestellung nachgegangen werden, in welchem Ausmaß Cd von den Hepatocyten aufgenommen wird. Die hierdurch bewirkte Zellmembranschädigung soll mit verschiedenen Methoden untersucht werden mit dem Ziel, das genaueste und durch das Metall Cd im Test selbst nicht beeinflußte Verfahren für den weiteren Einsatz in den folgenden Untersuchungen zu finden. Betrachtet werden in diesem Zusammenhang die Parameter TB-Anfärbbarkeit, die extrazelluläre LDH-Aktivität, die NADH-Penetration und die neu bzw. weiter entwickelten Tests "Digitonin-induzierte ANS-Fluoreszenz" und "Nitrophenylphosphat-Dephosphorylierung".
Einen weiteren Schwerpunkt nimmt die vergleichende Betrachtung des Verhaltens von Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten ein, um festzustellen, ob Hungertier-Hepatocyten hinsichtlich der Membranschädigung und des zellulären GSH-Gehalts empfindlicher auf Cd antworten als Kontrolltier-Hepatocyten, und ob, gegebenenfalls in welchem Maße,Cd Lipidperoxidation in ihnen hervorruft.
Weiterhin wird der Fragestellung nachgegangen, ob bzw. welcher Zusammenhang zwischen den in Abb.1 dargestellten Aspekten der Cd-Giftigkeit (Stimulation der LPO, Membranschädigung, GSH-Abnahme) besteht, mit dem Ziel herauszufinden, ob die Cd-abhängige LPO in Hepatocyten gehungerter Ratten direkt verantwortlich ist für die Cd-bedingte Abnahme des GSH-Gehalts und die Zunahme der Zellmembranpermeabilität.
Als Beispiel intrazellulärer Schädigung durch das Metall wird das Glutathion-Peroxidase-System näher untersucht mit dem Ziel, die Ursache der Cd-stimulierten LPO und der Änderung des

zellulären GSH-Gehalts zu ergründen. Hierzu wird untersucht, ob die Aktivitäten der Enzyme Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und der NADPH-generierenden Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und Malat-Enzym durch Cd beeinträchtigt werden.

Einen weiteren Schwerpunkt stellt die Untersuchung der funktionellen Integrität der Zelle in Gegenwart von Cd dar. An Hand des Energie-Status, des Lactat-Pyruvat-Quotienten und des O_2-Verbrauchs der Zelle soll herausgefunden werden, ob mitochondriale Prozesse durch Cd primär geschädigt werden und in welcher Weise Lipidperoxidation hierin einbezogen ist.

Weiterhin soll die Wirkung von Cd auf die Struktur (Schwellen und Rekontraktion) und Funktion (Substrat-Veratmung) isolierter Mitochondrien der Rattenleber untersucht werden. Im Vordergrund steht hier die Frage, ob Cd auch in Mitochondrien LPO stimuliert und ob dies im Zusammenhang mit Cd-bedingten Änderungen der Struktur steht.

Ebenfalls überprüft werden soll der Einfluß von essentiellen Metallen (Zn, Ca und Mn) auf Cd-bedingte Störungen der strukturellen und funktionellen Intaktheit der Zelle und auf die Cd-stimulierte Lipidperoxidation.

Abschließend wird diskutiert, welchen Stellenwert die Cd-bedingten Störungen der Mitochondrien-Funktion und die Peroxidation mitochondrialer Membranlipide in der Cd-Giftigkeit in isolierten Hepatocyten besitzen.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Behring, Marburg: Serumalbumin vom Rind

Boehringer, Mannheim: ADP, 5'-AMP, ATP, Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49), Glutathion-Peroxidase (EC 1.11.1.9), Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2), GSH, GSSG, Hyaluronidase (EC 3.2.1.35), Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42), Katalase (EC 1.11.1.6), NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, Phosphoenolpyruvat

EGA-Chemie, Steinheim: 2'-AMP

Fluka, Neu Ulm: L-Äpfelsäure, Ruthenium Rot

Linde, Altona: Carbogen

Merck, Darmstadt: ANS, $CaCl_2$, $CdCl_2$, $MnSO_4$, 4-Nitrophenylphosphat, Pyridoxal-5-Phosphat, Succinat, Triethanolamin-HCl, $ZnCl_2$, alle übrigen Laborchemikalien

NEN, Dreieich: ^{109}Cadmium

Serva, Heidelberg: Atractylosid, Carbonylcyanid-m-chloro-phenylhydrazon, L-Cystein, 2,4-Dinitrophenol, Glycylglycin, D,L-Isocitrat, L-Lactat, D,L-Methionin, Pyruvat, D,L-Serin, Trypan Blau

Sigma, München: 7-Desoxycholat, o-Phthaldialdehyd, Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1)

Wacker Chemie, München: Silikonöl AR 20 und AR 200

Worthington, München: Collagenase Typ II (EC 3.4.243)

Zyma, München: (+)-Cyanidanol-3 ((+)-Catechin)

Ruthenium Rot und Nupercain wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof.Dr.E.Noack (Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf) und mehr als 99% reines Paracetamol von Herrn Dr. W.Haas (Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf) überlassen.

3.2 Behandlung der Tiere

Versuchstiere waren weibliche Wistarratten mit einem Gewicht von 180-260 g. Sie erhielten das Standardfutter 1310 der Firma Altromin (Lage/Lippe) und Wasser ad libitum. 18 h vor Isolationsbeginn wurde -wenn nicht anders angegeben- den Tieren das Futter entzogen.
Die Präparationen begannen zwischen 9.00 und 12.00 Uhr. Die Tiere wurden mit Urethan (1.25 g/kg Ratte i.p.) in physiol. NaCl-Lösung narkotisiert. Durch Zusatz von 5000 I.E. Na-Heparinat (0.2 ml Liquemin 25000) wurde die Bildung von Thromben in der Leber während der operativen Behandlung der Tiere verhindert.

3.3 Isolierung von Leberparenchymzellen

Die Isolierung der Parenchymzellen erfolgte durch eine Ca^{2+}-freie Vorperfusion der Leber über die Portalvene mit anschließender Ca^{2+}-haltiger rezirkulierender Perfusion mit Collagenase und Hyaluronidase bei 37°C in-situ in Anlehnung an Berry und Friend (69).

Der Aufbau der Perfusionsapparatur (Abb.4) entspricht grundsätzlich den Angaben von Krebs et al. (70). Der Ausgang des mehrkugeligen thermostatisierbaren Oxygenators besitzt zusätzliche Stutzen zur Aufnahme einer O_2- und einer pH-Elektrode. Dies ermöglicht die kontinuierliche Kontrolle des O_2-Drucks (ca. 600 mm Hg) und des pH-Wertes (7.4 ± 0.02) im Perfusat. Beide Größen werden durch stete Begasung der Perfusionslösung mit Carbogen (95% O_2/5% CO_2; 500 ml/min) konstant gehalten.
Der durch die Höhendifferenz, 55 cm, zwischen Oxygenatorüberlauf und OP-Tisch bestimmte Perfusionsdruck an der Portalvene bewirkt eine Flußrate des Perfusats durch die Leber von 25-45 ml/min.
Perfusionslösung war eine auf 37°C temperierte nach Baur (71) modifizierte Ca^{2+}- und glucose-freie Hanks-Lösung (72) folgender Zusammensetzung: 121 mM NaCl, 18 mM $NaHCO_3$, 1.3 mM KCl, 1.6 mM $MgSO_4$ und 1.1 mM KH_2PO_4.

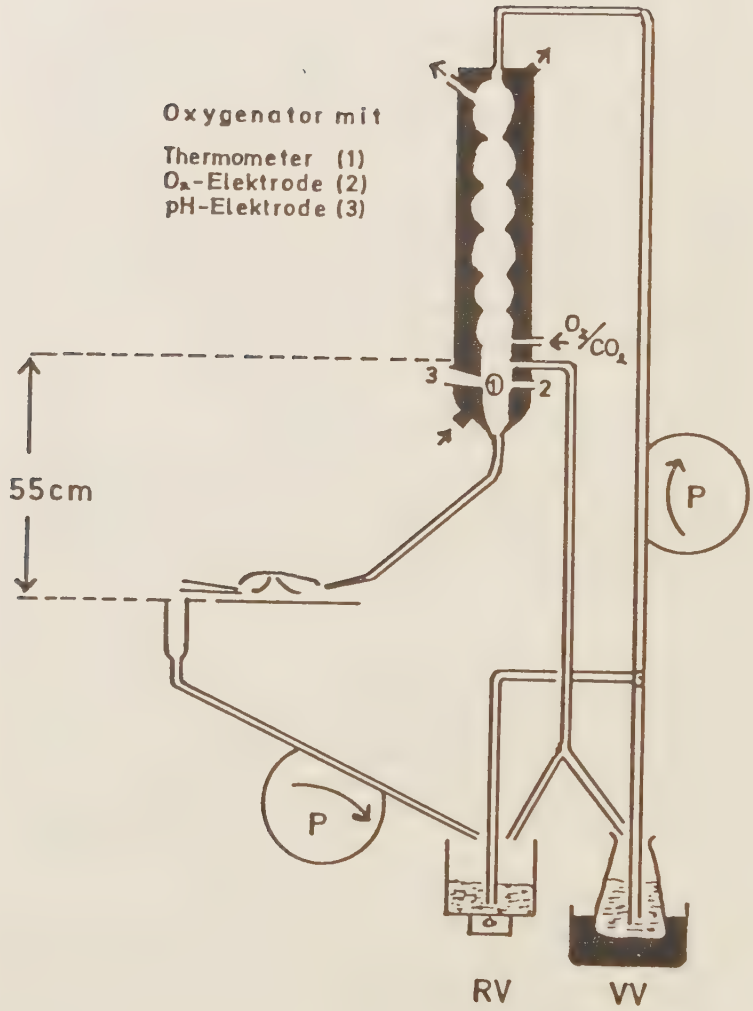


Abb.4: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur

Getönt: thermostatisiertes Wasser mit Strömung in Pfeilrichtung; R: Rollenpumpe; VV: Vorperfusionsvolumen; RV: Rezirkulationsvolumen

Abb.5: Isolierte Leberparenchymzellen der Ratte
Vergrößerung ca.600 fach

Die Leber wurde während 15 min blutfrei gespült. Die anschließende Perfusion erfolgte rezirkulierend mit 100 ml Lösung unter Zusatz von 0.5 mg/ml Collagenase, 0.2 mg/ml Hyaluronidase und $CaCl_2$ (Endkonz. 5 mM). Nach 15 min wurde das nun aufgeschlossene Lebergewebe in 50 ml Rezirkulations-Lösung suspendiert und nach Zusatz von 0.1 mg/ml DNase, Lactat, Pyruvat und $CaCl_2$ (Endkonz. 2.1 bzw. 0.3 bzw. 7.5 mM) während 30 min im Schüttelbad (37°C, 80 osc /min) unter Carbogen inkubiert. Die anschließenden Reinigungsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Entfernung nicht aufgeschlossener Teile wurde die Suspension durch Nylongewebe (150 µm Maschenweite) filtriert. Intakte Parenchymzellen wurden durch Zentrifugation (2 x 2.5 min, 11 x g; Heraeus Christ UJ III, Osterode) von Zellbruchstücken und Nichtparenchymzellen getrennt. Der letzte Waschgang (5 min, 11 x g) erfolgte mit Inkubationspuffer (s.u.).

Durch diese Isolationsmethode werden innerhalb von 90 min reproduzierbar hohe Ausbeuten an Leberparenchymzellen von 30-40% (w/w) der Feuchtleber mit reproduzierbar hoher Intaktheit der Zellen (> 94%, siehe Kapitel 3.5.1) erhalten. Voraussetzung ist jedoch, daß alle mit den Zellen in Berührung kommenden Glasflächen zuvor mit Dichlordimethyl-Silan/Toluol behandelt werden. Hierdurch werden Zellschädigungen durch Adhäsion vermieden.
Die lichtmikroskopische Betrachtung zeigt, daß eine homogene,weder von Zellbruchstücken noch von Nichtparenchymzellen kontaminierte, Population von Parenchymzellen erhalten wurde (Abb.5).

3.4 Inkubationen

3.4.1 Inkubationsbedingungen

Die Hepatocyten wurden in Inkubationspuffer folgender Zusammensetzung aufgenommen (Endkonz. 5-6 x 10^6 Zellen/ml):
114 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 0.7 mM $MgSO_4$, 0.3 mM $CaCl_2$, 27.8 mM Glucose und 10 mM Tris, pH 7.4. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 37°C im Schüttelwasserbad (80 osc/min) unter Carbogen vorinkubiert.
Inkubationen in Gegenwart der Agenzien erfolgten anschließend

mit 2 ml-Aliquots in 20 ml-Glas-Gefäßen bei 37°C im Schüttelwasserbad (50 osc/min) unter Luft.

3.4.2 Randbedingungen

Die relativ hohe Hepatocyten-Konzentration in der Suspension (s.o.) war erforderlich, um Metabolit-Konzentrationen sicher bestimmen zu können (s. Kapitel 3.7-3.9).
Die Zellkonzentration ist jedoch vergleichbar mit Angaben von Stacy und Kappus (41) und Högberg et al. (36) und beträgt nur die Hälfte bis ein Drittel der von Sies et al. (73) und Soboll et al. (74) eingesetzten Konzentration.
Die Salzkonzentration der Inkubationslösung entspricht den Angaben von Baur (71). Als einziges Substrat ist Glucose eingesetzt worden, deren Konzentration (4.6-5.6 µmole/10^6 Zellen) gleich (44) oder sogar 5-fach niedriger ist (46) als in Hepatocyten-Inkubaten anderer Autoren. In Übereinstimmung mit zahlreichen Arbeitsgruppen (18,20, 22, 41-43, 68,75) ist Tris als Puffersubstanz verwendet worden. Tris besitzt nicht die Eigenschaft häufig benutzter phosphat-gepufferter Inkubationssysteme (15,21,22,44,69,73-76), Cd extrazellulär zu binden (23, s.u.), so daß Interferenzen der Substanzen der hier verwendeten Inkubationslösung mit der Cd-Aufnahme (Kapitel 4.1) und den Cd-bedingten Schädigungen nicht zu erwarten sind. $NaHCO_3$ als Puffersubstanz ist entsprechend den Angaben anderer Autoren (18,20,22) nicht verwendet worden, da im hier benutzten offenen Inkubationssystem ohne fortlaufende Carbogen-Begasung (s.o.) das Konstanthalten der Konzentration des hinzugegebenen Bikarbonats nicht gewährleistet werden kann. Die Tris-Pufferung ist ausreichend, da der pH-Wert in der Suspension im Inkubationsablauf selbst in Gegenwart der höchsten Cd-Konzentration nur um maximal 0.2 Einheiten/90 min Inkubation vermindert wird.

3.5 Parameter der strukturellen Intaktheit der Hepatocyten

Zur Bestimmung der strukturellen (Zellmembran-) Intaktheit wurden die Parameter Trypan-Blau (TB)-Anfärbbarkeit, NADH-Oxidation und die durch Digitonin induzierte Zunahme der ANS-Fluoreszenz in der Gesamtsuspension gemessen. Mittels Zentrifugal-Filtration wurde außerdem der Prozentsatz extrazellulärer LDH-Aktivität sowie der in Suspension erfolgende Nitrophenylphosphat-Umsatz bestimmt.

3.5.1 Bestimmung der Trypan-Blau-Anfärbbarkeit

100 µl (1+10) verdünnter Zellsuspension wurden mit 50 µl TB-Lösung (0.5% in physiol.NaCl) auf einem Uhrgläschen vermischt. Anschließend wurden mindestens 200 Zellen in einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Kantenlänge kleines Quadrat 0.25 mm, Tiefe 0.2 mm) unter dem Lichtmikroskop auf Blaufärbung hin überprüft. Zellen mit angefärbtem Kern galten bereits als permeabel (20,71). Der Anteil TB-färbbarer Zellen an der Gesamtzellzahl betrug nach der Isolation ca. 6%.

3.5.2 Bestimmung der NADH-Oxidation

Die NADH-Oxidation (NADH-Penetration, LDH-Latenz (37,39,46,116)) wurde in Anlehnung an Högberg et al.(116) bestimmt: die Absorptionsabnahme von 0.1 mM NADH durch 20 µl Zellsuspension in 1 ml 52 mM Phosphat-Puffer, pH 7.5, wurde in Gegenwart von 0.67 mM Pyruvat bei 334 nm (Raumtemperatur) verfolgt. Die Werte wurden um den Leerwert der Absorptionsabnahme in Abwesenheit der Hepatocyten korrigiert.

3.5.3 Bestimmung der Digitonin-induzierten ANS-Fluoreszenz

Die Digitonin-induzierte Fluoreszenzzunahme von 8-Anilino-Naphthalin-Sulfonsäure-1 (ANS) wurde als zusätzliches Kriterium der Membranpermeabilität von Hepatocyten weiterentwickelt. Die Methode basiert auf der Beobachtung, daß ANS in Kombination mit Membranbestandteilen fluoresziert (75). Die Verfügbarkeit von Bindungs-

plätzen für ANS wird durch die Permeabilitätserhöhung der Zellmembran vermehrt . Eine erhöhte initiale ANS-Fluoreszenz, wie sie in Suspensionen mit vermehrtem Anteil membrangeschädigter Zellen gefunden wird (22,75), ist die Folge. Der initiale Anstieg läßt sich jedoch schwer standardisieren (22). Ausgehend von unterschiedlich hohen Fluoreszenz-Intensitäten, sollte jedoch die Differenz zu der Intensität, die in der Suspension vollkommen permeabler Hepatocyten beobachtet wird (75), ein Maß für den Prozentsatz noch nicht permeabler Zellen sein. Die Membranpermeabilität kann selektiv durch Zusatz geringer Konzentrationen von Digitonin, einem Steroid-Glycosid, erhöht werden (77,78). In Abwandlung der Angaben von Pfaff et al. (22) wurden 50 µl Zellsuspension mit 2.2 ml 0.25 M Saccharose/8 mM Tris (pH 7.5) und 111 µM ANS vermischt. Das Einstellen einer konstanten Fluoreszenz-Intensität (exc.: 348 nm; emm.: 480 nm) wurde abgewartet und die Differenz zur initialen ANS-Fluoreszenz nach Gabe von 50 µl Digitonin (Endkonz. 1.0 mg/l) bestimmt.

3.5.4 Zentrifugal-Filtration und Sedimentation

Lebensfähige Hepatocyten können durch die modifizierte Anwendung der an Mitochondrien-Suspensionen entwickelten Zentrifugal-Filtration durch Silikonöl von extrazellulärem Medium, geschädigten Zellen und Zell-Bruchstücken getrennt werden (18,20,68,77). Hierdurch werden Messungen intra- und extrazellulärer Ereignisse getrennt voneinander möglich.
Die Zentrifugal-Filtration von Hepatocyten wurde wie folgt durchgeführt: ein 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß wurde nacheinander mit 0.25 ml 3 M KOH, 0.5 ml einer Silikonölmischung (AR 200 und AR 20, 3+1, Raumtemperatur) und 0.25 ml Inkubationslösung beschickt, der zur Komplexierung des an der Zellmembran haftenden, nicht aufgenommenen Cadmiums in den Cd-Aufnahme-Experimenten (Kapitel 3.13 , 4.1 und 4.5.5) 2 mM EDTA (Endkonz.) zugesetzt wurde. In diesen Ansatz wurden 0.25 ml Hepatocyten-Suspension gegeben und das geschlossene Gefäß 8 sec. bei ca. 10000 x g (Beckman, Mikrofuge B) zentrifugiert.

Intakte Hepatocyten können auch durch Sedimentation aus der Zellsuspension, die intakte und membrangeschädigte Hepatocyten enthält, quantitativ erhalten werden. Dies geschieht durch milde Zentrifugation von Suspensions-Aliquots in Polyäthylen-Röhrchen bei 11 x g (1 min) in gleicher Weise wie bei der Reinigung der kontaminierten Parenchymzellsuspension während der Isolation (s. Kapitel 3.3). Abb.6 zeigt am Beispiel von kombinierten Zellansätzen aus membranintakten und vollkommen permeablen Hepatocyten (101), daß die TB-Anfärbbarkeit im resuspendierten Sediment durch das Sedimentations-Verfahren gegenüber der Ausgangssuspension erheblich vermindert werden kann.
Zur Parameter-Bestimmung wurden die sedimentierten Zellen mit Inkubationslösung (für Membranintaktheitsparameter s. Kapitel 3.5.1 und 3.5.2), bidest. Wasser (für Metabolite s. Kapitel 3.7-3.9) und 2 g/l Digitonin (für Enzymaktivitäten s. Kapitel 3.10) resuspendiert.

3.5.5 Bestimmung der Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27)

Die LDH-Aktivität wurde in der Triton-behandelten Suspension (= "Gesamtaktivität"; 0.5% Triton X-100 Endkonz.) und dem Oberstand der Zentrifugal-Filtration (Kapitel 3.5.4) auf der Grundlage des von Bergmeyer und Bernt (79) angegebenen Tests mit Pyruvat und NADH bestimmt.

3.5.6 Bestimmung des Nitrophenylphosphat (NPP)-Umsatzes

NPP wird durch die alkalische Phosphatase zu Nitrophenol (NP) dephosphoryliert, das bei 410 nm photometrisch bestimmt wurde. Die Zelle ist normalerweise für NPP nicht permeabel. Eine Zunahme der Membranpermeabilität sollte daher mit einer Änderung der NP-Absorption im Zentrifugal-Filtrations-Oberstand einhergehen. Die Bestimmung erfolgte in Abwandlung der Angaben von Rozengurt und Hebbel (80): 0.25 ml Zellsuspension wurden mit 6 mM NPP genau 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 0.25 ml Inkubationslösung wurden die intakten Zellen durch Zentrifugal-Fil-

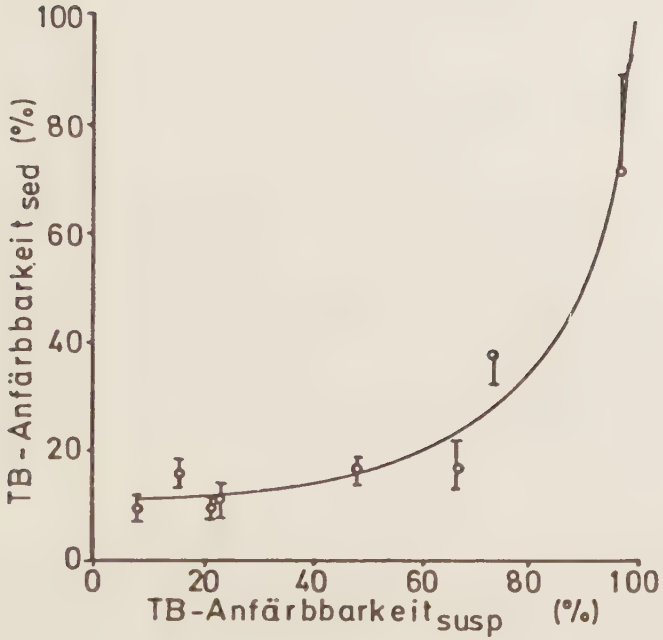


Abb.6: Beziehung der TB-Anfärbbarkeit in sedimentierten resuspendierten Hepatocyten zur initialen TB-Anfärbbarkeit in der Suspension

Hepatocyten-Suspensionen (5-6 x 10^6 Zellen/ml) unterschiedlicher TB-Anfärbbarkeit wurden nach Abschnitt 3.5.4 sedimentiert. Die im resuspendierten Zellpellet gefundene TB-Anfärbbarkeit (sed) ist gegen die TB-Anfärbbarkeit in der Suspension (susp) aufgetragen. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen

tration abzentrifugiert. Die Oberphase des Filtrationsansatzes wurde bei 10000 x g (1.5 min) zentrifugiert und Überstand 2 mit 1 N NaOH alkalisch gemacht. Nach genau weiteren 5 min wurde die Absorption im Überstand ermittelt.

3.6 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Protein-Konzentration wurde nach Lowry et al. (81) bestimmt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

3.7 Parameter der funktionellen Inaktheit der Hepatocyten

Als Parameter der funktionellen (metabolischen) Intaktheit der Hepatocyten wurden die nach Sedimentation der Zellen (s. Kapitel 3.5.4) erhaltenen zellulären Gehalte an Adenin-Nukleotiden (ATP, ADP und AMP) und Pyridin-Nukleotiden ($NADP^+$, NADPH) sowie an Lactat und Pyruvat bestimmt. Die Meßwerte wurden auf mg Protein resuspendierter Zellen bezogen. Weiterhin wurde der O_2-Verbrauch der Hepatocyten gemessen.

3.7.1 Bestimmung von ATP, ADP und AMP

Die Bestimmungen erfolgten im neutralisierten Überstand (10000 x g) der mit $HClO_4$ behandelten resuspendierten Zellen. ATP wurde mit Glycerat-3-Phosphat und Glycerinaldehyd-P-Dehydrogenase (GAP-DH, EC 1.2.1.12), 3-Phosphoglycerin-Kinase (PGK, EC 2.7.2.3), Glycerin-P-Dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.8) und Triosephosphat-Isomerase (TIM, EC 5.3.1.1) nach Bücher (82), ADP und AMP mit Phosphoenolpyruvat und LDH, Pyruvat-Kinase (PK, EC 2.7.1.40) und Myokinase (MK, EC 2.7.4.3) nach Jaworek et al. (83) bestimmt.

3.7.2 Bestimmung von NADPH und $NADP^+$

Die Pyridin-Nukleotide wurden in Anlehnung an Klingenberg (84) wie folgt extrahiert und bestimmt:

A: Die Gesamt-Nukleotide ($NADPH+NADP^+$) wurden mit 0.5 N alkoholischer KOH extrahiert, mit 0.5 M Tris + 0.4 M K_2HPO_4 neutralisiert und mit oxidiertem Glutathion (5 mM GSSG) und Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2) in $NADP^+$ übergeführt.

B: $NADP^+$ wurde mit $HClO_4$ extrahiert und mit 1 M KH_2PO_4 + 3 N KOH neutralisiert

$NADP^+$ wurde im Überstand des neutralisierten Ansatzes (10000 x g, 30 sec) mit Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) bei 334 nm bestimmt. Intern und extern mitgeführte Standards von $NADP^+$, NADPH und $NADP^+$+NADPH dienten zur Berechnung der Nukleotid-Konzentration.

3.7.3 Bestimmung von Lactat und Pyruvat

Lactat wurde mit NAD^+ und LDH nach Gutmann und Wahlefeld (85) und Pyruvat mit NADH und LDH nach Czok und Lamprecht (86) bestimmt.

3.7.4 Bestimmung des O_2-Verbrauchs

Der O_2-Verbrauch der Zellen wurde in einer 10 ml-O_2-Meßkammer mit einer Sauerstoff-Elektrode nach Clark (87) bei 37°C bestimmt. Hierzu wurden 2 ml Zellsuspension mit 7 ml glucosefreier, O_2-gesättigter Inkubationslösung verdünnt. Die Messung erfolgte während 3 min.

3.8 Bestimmung der Lipidperoxidation

Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde durch Nachweis des entstandenen Malondialdehyds (siehe Abb.2) mit Thiobarbitursäure (als Thiobarbitursäure-reaktives Material, TBA-RM) nach Reiner et al. (88) bestimmt. Zur Berechnung wurde sowohl der Extinktionskoeffizient ε-535 = 156 x 10^3 M^{-1} cm^{-1} als auch mitgeführte Standard-Konzentrationen von Malondialdehyd-(bisdiethyl-acetal) (44) herangezogen. In einigen Ansätzen wurde als weiterer Parameter der Lipidperoxidation die Dienkonjugation (siehe Abb.2) nach Högberg et al. (36) mitgemessen.

3.9 Bestimmung von SH-Gruppen und GSH

SH-Gruppen und GSH wurden im Überstand des säuregefällten Suspensions-Aliquots (10000 x g, 1.5 min, 4°C) gemessen. Die SH-Gruppen wurden photometrisch bei 405 nm nach Beutler (89) und GSH fluorimetrisch (exc. 350 nm; emm. 420 nm) nach Cohn und Lyle (90) be-

stimmt. GSH wurde in Standard-Konzentrationen mitgeführt. Der Anteil von GSH an den SH-Gruppen betrug zu Beginn der Inkubation 100.9 ± 1.9 % (n=5) und 98.5 ± 2.1 (n=4) in Hepatocyten gehungerter bzw. gefütterter Tiere. Dieser Prozentsatz wurde während 60 min Inkubation der Hepatocyten mit oder ohne 50 µM Cd nicht signifikant geändert, so daß die Konzentration der SH-Gruppen in Abwesenheit von extrazellulär verabreichtem GSH, Cystein oder Methionin (siehe Kapitel 4.4) dem GSH-Gehalt der Zellen entspricht.

3.10 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die durch Digitonin (2 g/l) während 15 min bei 4°C aufgeschlossenen sedimentierten Zellen (s. Kapitel 3.5.4) wurden zentrifugiert (ca. 8000 x g, 13 min, 4°C (29)), die Aktivitäten im Oberstand bestimmt und auf mg Protein der sedimentierten resuspendierten Zellen bezogen. Unspezifische Änderungen der NADPH-Absorption wurden durch Parallel-Messungen ohne Probe ausgeschlossen.

3.10.1 Bestimmung der Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) und der Glutathion-Reduktase (EC, 1.6.4.2)

Die GSH-Px wurde mit GSH, NADPH und t-BOOH (tertiär-Butylhydroperoxid) als Substrate nach Günzler et al. (91) und die Glutathion-Reduktase mit GSSG und NADPH in Anlehnung an Mavis und Stellwagen (92) bestimmt.

3.10.2 Bestimmung der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH, EC 1.1.1.42) und des Malat-Enzyms (EC 1.1.1.39)

Die Bestimmung der G6PDH erfolgte nach Löhr und Waller (93) mit Glucose-6-Phosphat als Substrat . ICDH wurde mit $NADP^+$ und Isocitrat nach Bernt und Bergmeyer (94) gemessen. Die Aktivität des Malat-Enzyms wurde mit $NADP^+$ und Malat in Anlehnung an Rutter und Lardy (95) bestimmt.

3.11 Fraktionierung der Hepatocyten

10 ml Hepatocyten-Suspension wurden nach Abschnitt 3.5.4 sedimentiert, einmal mit Inkubationslösung gewaschen, in 0.25 M Saccharose aufgenommen (96) und mit einem Teflon Glashomogenisator (Potter Elvehjm; 0.3 mm Toleranz zwischen Glaswand und Teflonstempel) bei 1500 rpm homogenisiert. Durch 10 minütige Zentrifugation des Homogenats bei ca. 800 x g (Beckman, Rotor JA 14) wurden Zellmembranen, zerstörte Zellen und Kerne im Pellet erhalten. Durch Zentrifugation des Oberstands (ca. 9000 x g) wurden Mitochondrien sedimentiert. Aus dem Oberstand wurden die Mikrosomen (Endoplasmatisches Retikulum) durch 60 min Zentrifugation bei 105000 x g erhalten. Der letzte Oberstand entsprach der Cytosol-Fraktion.

3.12 Isolierung der Mitochondrien

Die Leber der Ratte wurde in-situ mit einer eiskalten Lösung aus 0.175 M KCl und 25 mM Tris (pH 7.4) blutfrei gespült, zerschnitten und in 0.25 M Saccharose (3 ml/g Feuchtleber) wie unter Abschnitt 3.12 homogenisiert und fraktioniert. Die Mitochondrien-Fraktion wurde einmal gewaschen (10 min, 7000 x g) und das Pellet in 0.175 M KCl/25 mM Tris, pH 7.4 (65) aufgenommen. Die bei 37^{o}C unter fakultativer Carbogen-Begasung vorgenommenen Inkubationen begannen sofort nach Suspendieren der Mitochondrien.

3.13 Bestimmung der Cd-Aufnahme und des Cd-Gehalts

Hepatocyten wurden in Gegenwart von radioaktivem Cd (Cd-109, 57.4-63.5 nCi/ml) und nicht radioaktivem Cd inkubiert (s. Kapitel 4.1 und 4.5.5). Intakte Zellen wurden durch Zentrifugal-Filtration in die Unterphase filtriert (Kapitel 3.5.4). Die Radioaktivität der Unterphase wurde im Gamma Counter 4000 (Beckman Instruments, München) bestimmt. Die Wiederfindungsrate im Gesamtansatz (Oberphase + Unterphase) betrug 101.8 $\pm$ 0.9 % (n=46) der eingesetzten Radioaktivität. Protein wurde in parallel laufenden Zentrifugal-Filtrations-Ansätzen bestimmt.

Zur Bestimmung des Cd-Gehalts wurden Proben der Gesamtsuspension, der radioaktiven Stammlösung sowie Lösungen standardisierten Cd-Gehalts als Referenz mit HNO_3 (1+2) 4h bei 160°C naß verascht. Die Cd-Messung erfolgte flammenlos im Atomabsorptions-Spektrophotometer 400 (Perkin Elmer, Oberlingen) bei einer Wellenlänge von 228.8 nm.

3.14 Bezugswerte

Die in Tabelle 1 zusammengefaßten Bezugswerte für isolierte Hepatocyten gehungerter Ratten ermöglichen den Vergleich der Daten dieser Arbeit mit Literaturwerten.

3.15 Meßwerterfassung und Signifikanz

Die Mittelwerte aus Doppel-Bestimmungen der einzelnen Präparation bildeten die Einzelwerte. Sie wurden aus mindestens 3 verschiedenen Präparationen zu einem Mittelwert zusammengefaßt und der mittlere Fehler der Einzelwerte (Sx) oder der mittlere Fehler des Mittelwertes ($S\bar{x}$) angegeben. Werte ohne Fehler-Angabe sind Einzelwerte aus 3 ähnlich verlaufenden Untersuchungen.
Signifikante Unterschiede zwischen den Werten wurden mittels t-Test nach Student bestimmt. Signifikanzen ohne Angabe des Wahrscheinlichkeits-Levels beziehen sich auf die 5% Schranke.

Umrechnungsfaktoren für Bezugswerte

FG (mg)/10^6 Zellen	6.52 ± 0.01	n= 12
10^6 Zellen/mg Protein	0.70 ± 0.02	n= 15
FG (mg)/mg Protein	9.34 ± 0.65	n= 12
FG (mg)/TG (mg)	3.74 ± 0.13	n= 7

Tab.7: Umrechnungsfaktoren für Bezugswerte in Hepatocyten-Suspensionen gehungerter Ratten

Angaben sind Mittelwerte ± $S\bar{x}$ aus n Präparationen. Das Feuchtgewicht der Zellen (FG) ist in Anlehnung an Seglen (97) bestimmt worden: 0.5 ml Suspension werden in einem vorgewogenen Eppendorf-Gefäß 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert, der Oberstand verworfen und die noch anhaftende Flüssigkeit mit Kleenex-Tuch abgetupft. Die Auswaage erfolgt nach 15 min bei Raumtemperatur. Das Trockengewicht der Zellen (TG) wird nach Trocknen des FG bei 100°C über Nacht bis zur Gewichtskonstanz bestimmt

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Aufnahme von Cadmium in Hepatocyten gehungerter Ratten

Die Gewebskonzentration des Schwermetalls Cadmium, nicht jedoch die applizierte Metall-Dosis, entscheidet über die Ausbildung klinischer Vergiftungssymptome in in-Vivo-Experimenten (98). Voraussetzung für das Auftreten Cd-bedingter Zellschädigung ist daher die Aufnahme des Metalls durch die Zellen. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird Cd zu einem hohen Prozentsatz in die Leber und dort in die Parenchymzellen aufgenommen. Aufnahmestudien von Cd sind u.a. an Tumorzellen (16), Zellkulturen (17,19,99), aber auch an Suspensionen isolierter Leberparenchymzellen der gefütterten Ratte durchgeführt worden (68). Die Cd-Aufnahme ist dagegen in Hepatocyten gehungerter Ratten bisher nicht untersucht worden und soll daher im folgenden behandelt werden.

Abb.7 zeigt, daß Cd auch von Hungertier-Hepatocyten in hohem Maße aufgenommen wird. Die Cd-Aufnahme ist sowohl konzentrations- als auch zeit-abhängig (Abb.7 A,C). Sie korreliert linear mit der angebotenen Cd-Konzentration in der Suspension im Bereich von 2-25 µM Cd für die Inkubationszeiten 1, 2.5, 10, 15 und 30 min (R=0.99) (nicht dargestellt). Ähnlich enge Korrelationen zwischen Cd-Angebot und Cd-Aufnahme sind für Hamster-Ovarial-Zellen (19) und für Futtertier-Hepatocyten (17,100) beschrieben worden.
Nach 30 und 60 min befinden sich 50-80% des extrazellulär angebotenen Cd (Konzentration in der Suspension 2-720 µM Cd) in den Hepatocyten, bezogen auf Masse Zellprotein. Der zeitliche Verlauf der Cd-Aufnahme entspricht einer Sättigungskurve mit einer hohen initialen Metall-Aufnahme (30-150 sec; $v_0 max$ = 2.3 nmol Cd /mg Protein x min, Abb.7 B), gefolgt von einer langsameren Phase zunehmender Akkumulation (5-60 min) (Abb.7 A,C). Die Cd-Aufnahmerate (v_0) sowie die prozentuale Cd-Aufnahme in Hepatocyten ist höher als nach Angaben von Stacey (18,68) und Failla et al. (99) berechenbar ist. Dies mag an der Verwendung phosphat- (18,68) und proteinreicher Inkubationslösungen (19,99) durch diese

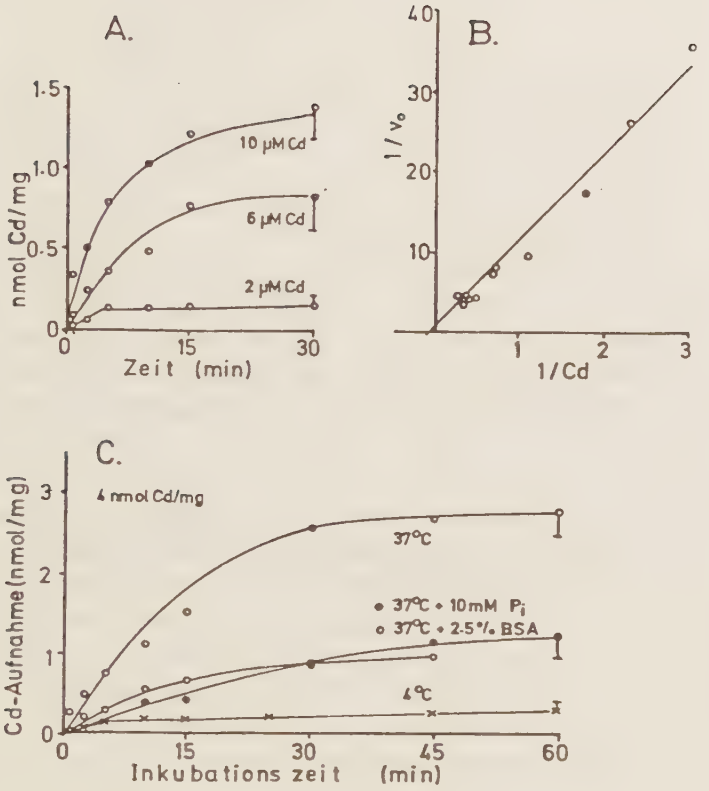


Abb.7: Cd-Aufnahme in Hepatocyten gehungerter Ratten

5-6 x 10^6 Zellen/ml wurden unter Luft während der angegebenen Zeiten inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen.

A: Cd-Aufnahme in Gegenwart unterschiedlicher Cd-Konzentrationen während der Inkubation bei 37°C

B: Initiale Cd-Aufnahme: Inkubationsmodus wie in A.Die Cd-Konzentration ist in nmol/mg Zellprotein der Suspension angegeben; die Aufnahmerate v_0 ist aus den während 30-150 sec erhaltenen Cd-Konzentrationen in der Zelle berechnet; v_0 ist in nmol Cd/mg Protein x min angegeben; v_0max = 2.33 nmol Cd /mg x min.

C: Cd-Aufnahme bei 37°C (o) und 4°C (x) und in Anwesenheit von 10 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7.4 (P_i •) oder 2.5% Rinderserumalbumin (BSA o) bei 37°C.

Autoren liegen: beide Situationen führen in meinen Inkubationsansätzen zu einer mehr als 50 %igen Einschränkung der Cd-Aufnahme (Abb.7 C; siehe auch Kapitel 3.4.2). Cd wird wahrscheinlich extrazellulär gebunden (7,19,23,99), so daß die zur Aufnahme frei verfügbare Cd-Konzentration herabgesetzt wird (19).

Wie Abb 7 C weiter zeigt, ist die Cd-Aufnahme temperaturabhängig. Der Temperatur-Koeffizient Q_{10} ($\lg Q_{10} = 10/(T_2-T_1)) \times \lg$ (Aufnahme bei T_2/Aufnahme bei T_1) berechnet sich zu 1.65 $\pm$ 0.1 (n=3). Dieser Wert liegt zwischen dem Koeffizienten bei reiner Diffusion (bis 1.4) und dem bei reinem Trägertransport ($>$ 2). Dies im Zusammenhang mit der Sättigungscharakteristik der Cd-Aufnahme (Abb.7 A,C) und der an anderer Stelle (Kapitel 4.5.5) berichteten Cd-Zn-Interaktion an der Zellmembran (19,99) läßt vermuten, daß -ebenso wie für andere Zellsysteme angenommen (19,68,99)- auch in Hepatocyten gehungerter Ratten Cd Träger-vermittelt aufgenommen wird.

In der Beurteilung der Cd-Giftigkeit wird im folgenden die Höhe der Cd-Aufnahme mit einbezogen. Die Cd-Aufnahme wird nicht gesondert erwähnt, wenn sie in Gegenwart der verschiedenen in die Inkubation eingebrachten Agenzien nicht vom Normwert abweicht.

4.2 Eignung von Parametern struktureller Intaktheit zur quantitativen Beschreibung Cadmium-bedingter Änderungen der Zellmembranpermeabilität in Hepatocyten gehungerter Ratten

Das von Hepatocyten aufgenommene Cd bewirkt Änderungen der Zellstruktur, d.h der strukturellen Intaktheit der Zellen (siehe Einleitung) im Ablauf einer Inkubation. Abb.8 verdeutlicht, daß die Zellmembran-Begrenzung nach 30 min Inkubation der Hepatocyten mit 100 µM Cd nicht mehr eindeutig im lichtmikroskopischen Bild darstellbar ist. Dieser morphologisch nachweisbaren tiefgreifenden Schädigung der Zelle durch Cd, die nur eine qualitative Aussage über die Wirkung des Metalls gestattet und hier nicht weiter untersucht werden soll, geht die Permeabilitätserhöhung der Membran für kleine Moleküle und Enzyme voraus, die quantitativ erfaßt werden kann.
Da die Lipidperoxidation in Zusammenhang mit der Zellmembranschädigung gebracht wird (33,34), ist es zunächst erforderlich, das Ausmaß der Membranschädigung bzw. die Anzahl der in der Suspension membrangeschädigten Hepatocyten festzustellen.

Gebräuchliche Verfahren zur qualitativen und quantitativen Beschreibung der Einschränkung der Membranfunktion sind der Verlust zellulärer Enzyme (18,20-22,41-44,71,97,101), die Penetration von NADH durch die Zellmembran und nachfolgende Oxidation (37,39,46,116), sowie die Anfärbbarkeit der Zellen mit Trypan Blau (20,36,45,69,71, 75,76,101).

Ziel meiner Untersuchung ist es, festzustellen, ob diese Parameter und die neu eingeführten Kriterien NPP-Umsatz und Digitonin-induzierte ANS-Fluoreszenz miteinander vergleichbar sind und ob ihre Anwendung zu gleichwertigen Aussagen über den Grad der Cd-bedingten Zellschädigung führen.

Abb.9 zeigt, daß in kombinierten Suspensionen aus vitalen ($<10\%$ TB-Anfärbbarkeit) und größtenteils permeablen Zellen (101) alle Parameter eng linear mit der Anzahl TB-färbbarer Zellen korrelieren ($R=0.98$). Die TB-Methode (Kapitel 3.5.1) kann daher prinzipiell die anderen angegebenen Nachweisverfahren der Membran-Intaktheit ersetzen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Baur et al.

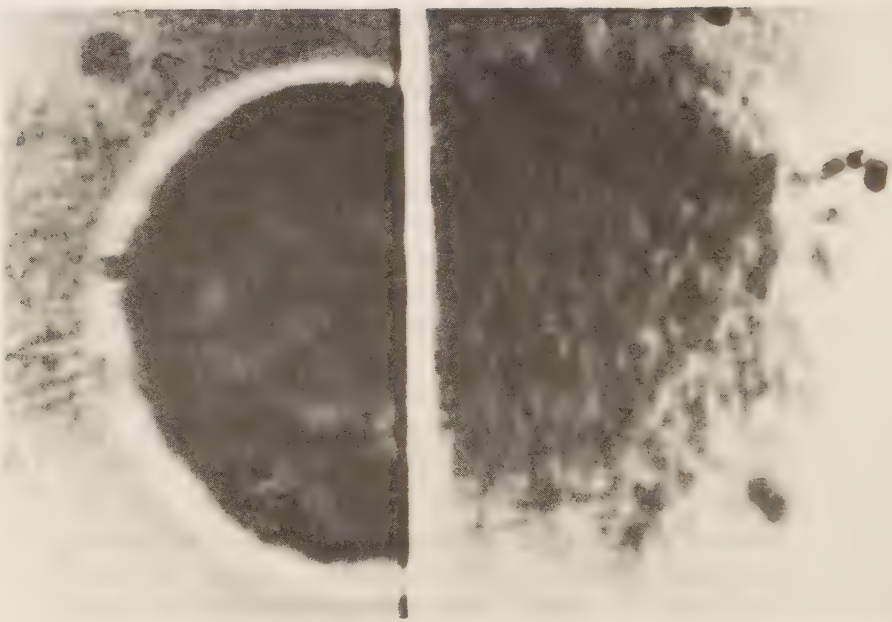


Abb.8: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Leberparenchymzelle nach 30 min Inkubation in Gegenwart von 0 (links) oder 100 µM Cd (rechts); Vergrößerung ca. 3000-fach

(20) und Thor et al. (46) im Vergleich der TB-Anfärbbarkeit mit der extrazellulären LDH-Aktivität bzw. mit der NADH-Penetration.
Dies bedeutet jedoch nicht, daß auch die Cd-bedingte Membranschädigung als Ausdruck der Metall-Giftigkeit mit diesen Methoden empfindlich erfaßt werden kann. Cd kann z.B. mit SH-haltigen Enzymen reagieren (7,23) und damit deren Aktivität beeinträchtigen. Die Lactat-Dehydrogenase enthält SH-Gruppen (31), so daß -bei gegebener Interaktion mit Cd- die Aussagekraft des LDH-Tests und der NADH-Penetrationsmethode geschmälert würde.

Inkubationen (15 und 30 min, 37°C) von 10000 x g Überständen Triton X-100-behandelter Zellen (Kapitel 3.5.5) mit 10-250 µM Cd haben jedoch nicht zu einer Verminderung der Gesamt-LDH-Aktivität geführt (nicht dargestellt). Cd übt also keinen direkten Effekt auf das Enzym aus. Der während der Inkubation von Hepatocyten mit dem LDH-Test gemessene Prozentsatz geschädigter Zellen in Gegenwart von Cd ist geringer (Abb. 10 A) als mit den anderen Methoden bestimmbar (Abb.10 A-D). Dies ist -insbesondere im Vergleich mit der NADH-Penetration- Ausdruck einer geringeren Empfindlichkeit des LDH-Tests zur quantitativen Darstellung der Membranschädigung in der Zellsuspension; LDH tritt offensichtlich erst bei einer größeren Schädigung aus der Leberzelle aus. Empfindlich, jedoch unsicher ist das Kriterium NPP-Umsatz, da gleichzeitig mit der NPP-Aufnahme durch die Zellen (Abnahme extrazellulären NP) auch der durch die alkalische Phosphatase geschädigter Zellen extrazellulär vermehrte NPP-Umsatz (Zunahme des extrazellulären NP) gemessen wird (Abb.10 C).

Aus den Abbildungen 9, 10 A,B und D wird jedoch deutlich, daß die eng korrelierten Membran-Intaktheitskriterien NADH-Penetration (Oxidation) und TB-Anfärbbarkeit, aber auch die Digitonin-induzierte ANS-Fluoreszenz gleichermaßen empfindlich die Schädigung der Zellmembran an sich (Abb.9) und in Gegenwart von Cd (Abb.10) charakterisieren.

Die TB-Methode gestattet zudem neben einer schnellen,(im Gegensatz zur ANS-Fluoreszenz und besonders zur NADH-Oxidation) nur

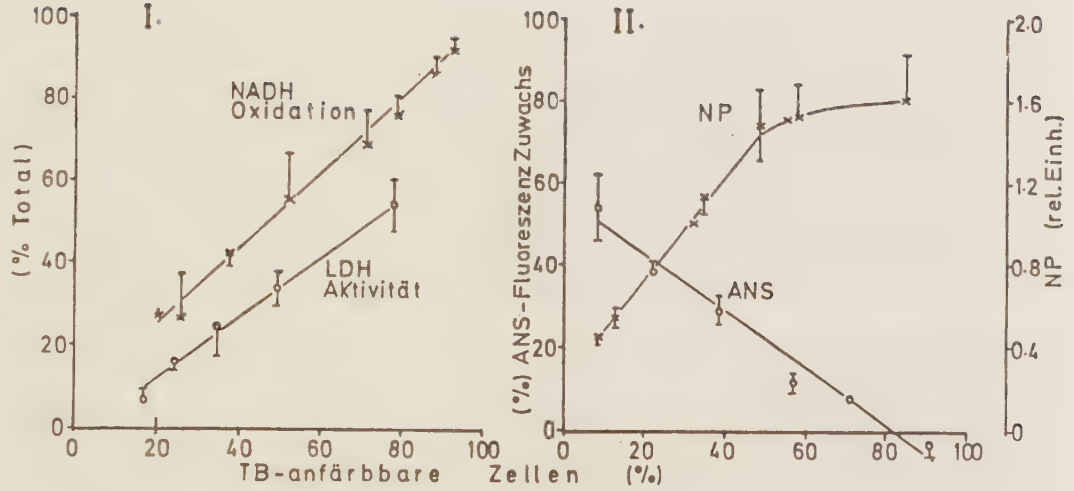


Abb.9: Korrelationen von Parametern der strukturellen Intaktheit mit der initialen TB-Anfärbbarkeit

Suspensionsaliquots frisch isolierter Hepatocyten (TB-Anfärbbarkeit < 10%) wurden durch Frieren in flüssiger Luft permeabilisiert (TB-Anfärbbarkeit > 90%). Die Bestimmungen erfolgten sofort nach Kombinieren vitaler und permeabler Zellen zu unterschiedlichen initialen TB-Anfärbbarkeiten. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-5 Präparationen.

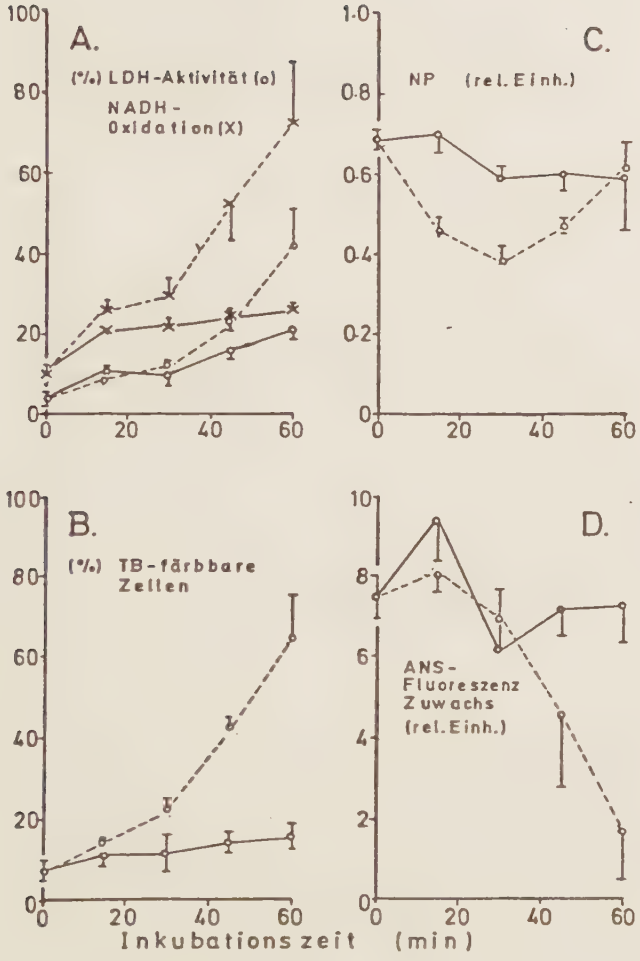


Abb.10: Einfluß von Cd auf Parameter der strukturellen Intaktheit von Hepatocyten

Hepatocyten (TB-Anfärbbarkeit >10%) wurden ohne (——) oder mit 50 µM Cd (– – –) wie in Abb.7A inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± $S\bar{x}$ aus mindestens 3 verschiedenen Präparationen.

geringen Abweichungen unterliegenden, Meßwerterfassung die gleichzeitige Bestimmung der Zellzahl und die optische Beurteilung noch nicht gefärbter Zellen. Im folgenden wird u.a. aus diesen Gründen die TB-Anfärbbarkeit zur Darstellung der Membran-Intaktheit den oben genannten anderen Verfahren vorgezogen.

4.3 Vergleich der Empfindlichkeit von Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten gegenüber Cadmium an Hand der Parameter TB-Anfärbbarkeit, SH-Gruppen und Bildung TBA-reaktiven Materials

24 oder 48 h gehungerte Tiere reagieren in der Regel empfindlicher auf lebergiftige Substanzen als gefütterte Tiere (8). Fasten verstärkt z.B. die Hepatotoxizität von Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) (47,48), Chloroform ($CHCl_3$) (49), Paracetamol und Brombenzol (50). Obwohl ein Einfluß des Ernährungszustands auf die Cd-Giftigkeit angenommen werden kann (6,8), sind toxikologische Untersuchungen (36-39,41-46), speziell hinsichtlich der Cd-Wirkung (18,42,43), bisher vorrangig an Geweben gefütterter Tiere vorgenommen worden.

Fasten führt jedoch neben zahlreichen anderen Ereignissen zu einer verminderten Fähigkeit der Zellen, membranstabilisierendes Cholesterin zu synthetisieren (102). Es vermindert zudem den GSH-Gehalt der Zellen (50,51), beeinträchtigt hierdurch die zelluläre Schutzfunktion gegenüber Lipidperoxiden (siehe Einleitung), und es vermehrt die hepatische Konzentration peroxidabler Fettsäuren (49,103).

Im folgenden soll daher untersucht werden, ob Hepatocyten gehungerter im Vergleich zu denen gefütterter Tiere in Hinblick auf Membranpermeabilität und GSH-Gehalt empfindlicher auf Cd-Belastung antworten. Es soll weiterhin festgestellt werden, ob Cd im Hungerzustand ebenso wie unter Norm-Bedingungen (18,42,43) Lipidperoxidation stimuliert.

Aus Abb.11 geht hervor, daß Cd von Hepatocyten beider Populationen im gleichen Maße zeit- und konzentrationsabhängig aufgenommen wird (Vgl. Kapitel 4.1).
Dennoch bewirken 50-100 µM Cd vornehmlich in Hepatocyten gehungerter Ratten eine starke Vermehrung der Membranpermeabilität, dargestellt als TB-Anfärbbarkeit in der Hepatocyten-Suspension (Abb.12, unten). Ebenso führt Digitonin, ein spezifisches Zellmembran-Detergenz (Kapitel 3.5.3), bevorzugt in Hepatocyten gehungerter Ratten zur Zunahme der TB-Anfärbbarkeit (Tab.2).

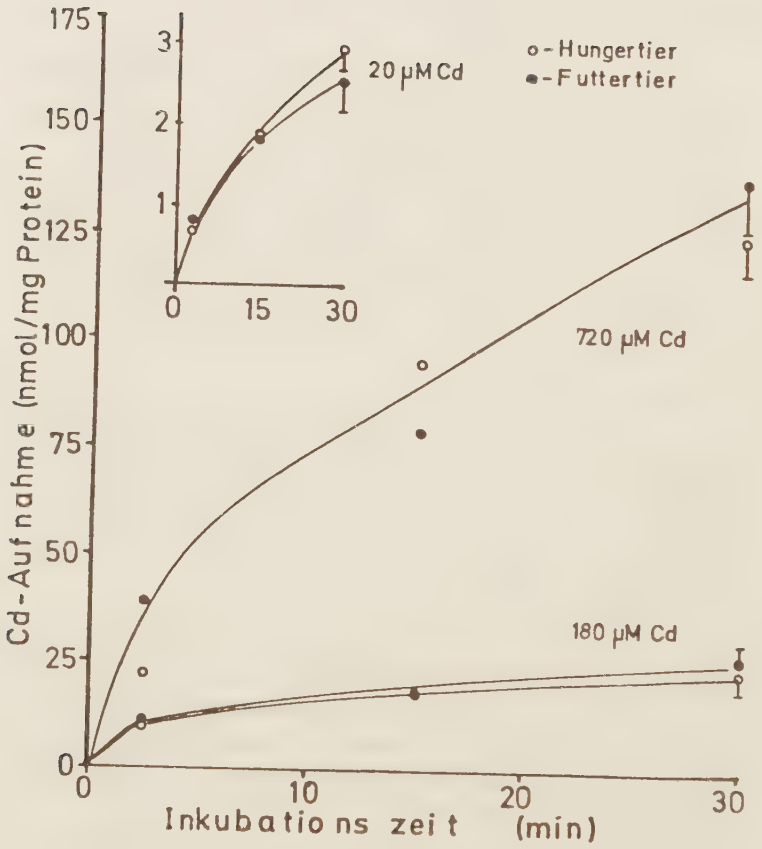


Abb.11: Vergleich der Cd-Aufnahmen in Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten

Je 5-6 x 10^6 Zellen/ml wurden in Gegenwart der angegebenen Cd-Konzentrationen bei 37°C unter Luft inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-4 Präparationen

Behandlung	H	F
	TB-Anfärbbarkeit (%)	
- Dig	14.5 ± 2.9	10.9 ± 2.1
- Dig + 50 µM Cd	19.9 ± 4.0	11.2 ± 2.1
+ Dig	44.0 ± 1.4[a)]	12.6 ± 2.2
+ Dig + 50 µM Cd	44.6 ± 1.9[a)]	17.4 ± 2.0[a)b)]

Tab.2: Einfluß von Digitonin auf die TB-Anfärbbarkeit von Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten

Hepatocyten von gehungerten (H) und gefütterten Ratten (F) würden ohne oder mit 1.4 mg Digitonin (Dig)/100 ml 30 min inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-5 Präparationen. Die Werte sind signifikant unterschieden ($p < 0.001$) von Kontrollen ohne (a) oder mit Digitonin (b).

Das Verhalten der Futtertier-Hepatocyten gegenüber diesem Detergenz macht deutlich, daß Digitonin die Cd-bedingte Permeabilitätssteigerung unterstützt (Tab.2). Dies zeigt, daß die vermehrte Empfindlichkeit der Hungertier-Hepatocyten Ausdruck einer durch das Fasten hervorgerufenen verminderten Membranstabilität sein kann. Die Digitoninwirkung basiert auf der Interaktion dieser Substanz mit membrangebundenem Cholesterin (77,78). Seine den Cd-Effekt verstärkende Wirkung ist möglicherweise auf einer verminderten Cholesterin-Einlagerung in die Membran zurückzuführen (102).

Die aus diesen Ergebnissen abzuleitende stärkere Empfindlichkeit von Hepatocyten gehungerter Ratten gegenüber Cd spiegelte sich auch im Verhalten der zellulären SH-Gruppen wider (Abb.12). Der initiale GSH-Gehalt war mit 2.3 µmol SH/g Leber (umgerechnet aus Tab.1 und Angaben in (104)) in beiden Hepatocyten-Populationen gleich hoch. Dies ist auf die Isolations- und Vorinkubationsprozedur zurückzuführen (Kapitel 3.3-3.4.1), da Hepatocyten bei 37°C in inkompletten Medien GSH verlieren (46,51). Cd bewirkt jedoch nur in Hepatocyten gehungerter Ratten eine starke (mit R=-0.988 lineare) Abnahme der zellulären SH-Gruppen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (60 min) und der Cd-Konzentration. Der GSH-Gehalt -der nach Abschnitt 3.9 durch den SH-Gruppen-Gehalt verläßlich wiedergegeben werden kann- bleibt dagegen in den Kontroll-(Futtertier)-Hepatocyten über die gesamte Inkubationsdauer und selbst in Gegenwart von 100 µM Cd unverändert vom Ausgangswert (Abb.12).

Anundi et al. (105) beschreiben eine ähnlich starke Beeinträchtigung der Membran-Integrität und des GSH-Gehalts in mit Selenit vergifteten Hepatocyten gehungerter Tiere. Dies weist auf eine besondere Anfälligkeit der untersuchten Parameter gegenüber toxischen Agenzien unter der Bedingung des Hungerzustands hin.

Die Bildung TBA-reaktiven Materials wird durch Cd in Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten in etwa gleichem Ausmaß zeit- und konzentrationsabhängig stimuliert (Abb.12, oben). Kontroll-Untersuchungen haben ergeben, daß in Gegenwart von Cd (100 µM Cd, 45 min) das Ausmaß der Dienkonjugation (Einleitung, Abb.2) entsprechend zunimmt. Dies zeigt, daß die Bildung TBA-reaktiven

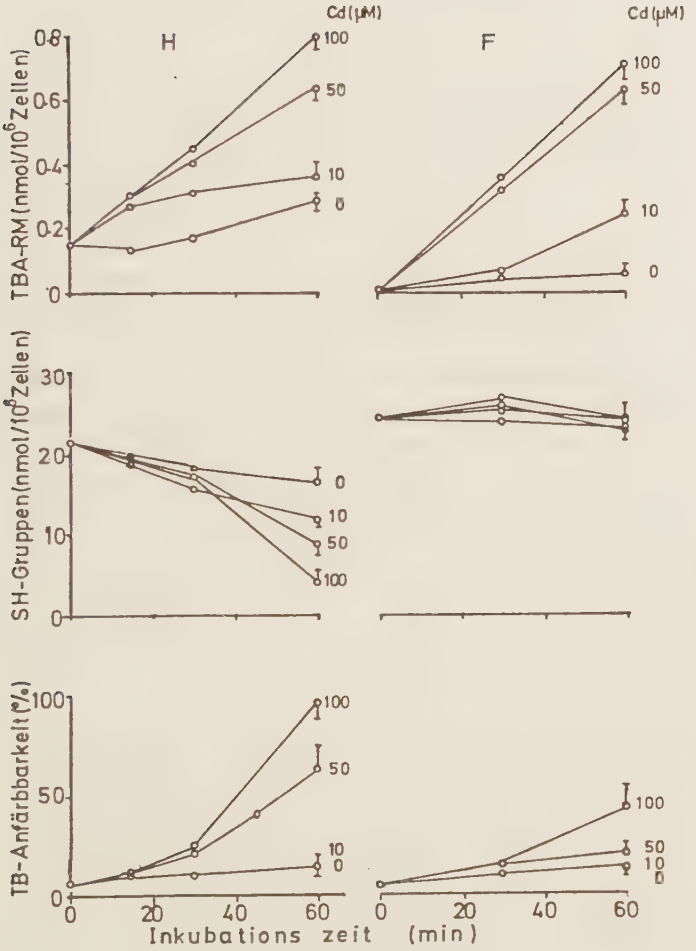


Abb.12: Vergleich des Verhaltens von Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten in Gegenwart von Cd

Hepatocyten gehungerter (H) und gefütterter Ratten (F) wurden wie in Abb.11 inkubiert. TBA-RM: Thiobarbitursäure-reaktives Material. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 5-8 Präparationen.

Materials unter Cd-Belastung die Cd-bedingte Lipidperoxidation in Hepatocyten repräsentiert.

Die Hepatocyten gehungerter wie gefütterter Ratten verhalten sich also bezüglich der Cd-Aufnahme und der Cd-induzierten LPO etwa gleich, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Cd-bedingten Änderungen der Membranpermeabilität und des GSH-Gehalts. Es erscheint dadurch möglich, daß die Lipidperoxidation nicht unmittelbar mit der Schädigung der Membran zusammenhängt. Derartige Vermutungen sind bereits von anderen Autoren (18,42,43) auf Grund von Befunden mit Cd an Hepatocyten gefütterter Ratten geäußert worden. Die Leberzellen gehungerter Tiere reagieren jedoch wesentlich empfindlicher auf Cd, wobei die Zunahme TBA-reaktiven Materials, der TB-Anfärbbarkeit und die Abnahme des GSH-Gehaltes -insbesondere in Gegenwart höherer Cd-Konzentrationen- weitgehend parallel verlaufen. Es erscheint danach zweifelhaft, ob die oben geäußerte Vermutung auch unter den Bedingungen des Hungerzustandes richtig ist. Diese Unklarheiten sollen durch die folgenden Untersuchungen beseitigt werden (s.Kapitel 4.4).

4.4 Untersuchungen zum Zusammenhang der Ereignisse TB-Anfärbbarkeitszunahme, Bildung TBA-reaktiven Materials und Abnahme der SH-Gruppen in Cadmium-vergifteten Hepatocyten gehungerter Ratten

Untersuchungen der ADP-Fe^{3+}-(36), der Jodacetamid-(37) und der Chloroform (39)-stimulierten LPO u.a. deuten auf einen engen Zusammenhang zwischen LPO-Stimulation, GSH-Abnahme und Membranschädigung hin.

Das vorangegangene Kapitel (4.3) belegt, daß Cd einen Einfluß auf alle drei Größen in Hungertier-Hepatocyten ausübt. Da die Lipidperoxidation als grundlegendes Prinzip der schädigenden Wirkung vieler toxischer Substanzen angenommen werden kann (Übersichten: 32-34), könnte die zelluläre Anhäufung von Lipidperoxiden insbesondere in Hepatocyten gehungerter Ratten für den zellzerstörenden Effekt von Cd verantwortlich sein.

Im folgenden wird daher versucht, die Rolle der LPO für die Cd-bedingte Membranpermeabilitätsänderung und die Abnahme des GSH-Gehalts unter Hunger-Bedingungen zu klären. Folgende Fragen sind hierzu untersucht worden:

1. Ist die Cd-bedingte Änderung der Membranpermeabilität für die Stimulation der LPO und die Abnahme des GSH-Gehalts verantwortlich ?
2. Kann die Cd-bedingte LPO und die Membranpermeabilitätsänderung durch Vermehren der zellulären SH-Gruppen verhindert werden ?
3. Kann die Cd-bedingte GSH-Abnahme und Membranpermeabilitätsänderung durch Hemmung der LPO verhindert werden ?

1. Einfluß von Cd auf die Zellmembran

Wie in der Einleitung erwähnt, kann Cd direkt mit Membranen reagieren (23-26) und hierdurch zur Permeabilitätssteigerung der Zellen führen (Abb.1). Durch Sedimentation der Zellen (Kapitel 3.5.4) können Hepatocyten erhalten werden, die wohl Cd aufgenommen haben (Vgl. Kapitel 4.5.1), deren Membranen jedoch größtenteils noch nicht permeabel für Trypan Blau sind. Das Verhalten der im resuspendierten Zellpellet bestimmten Parameter ist in Abb.13 dargestellt: TBA-reaktives Material wird vermehrt gebildet und

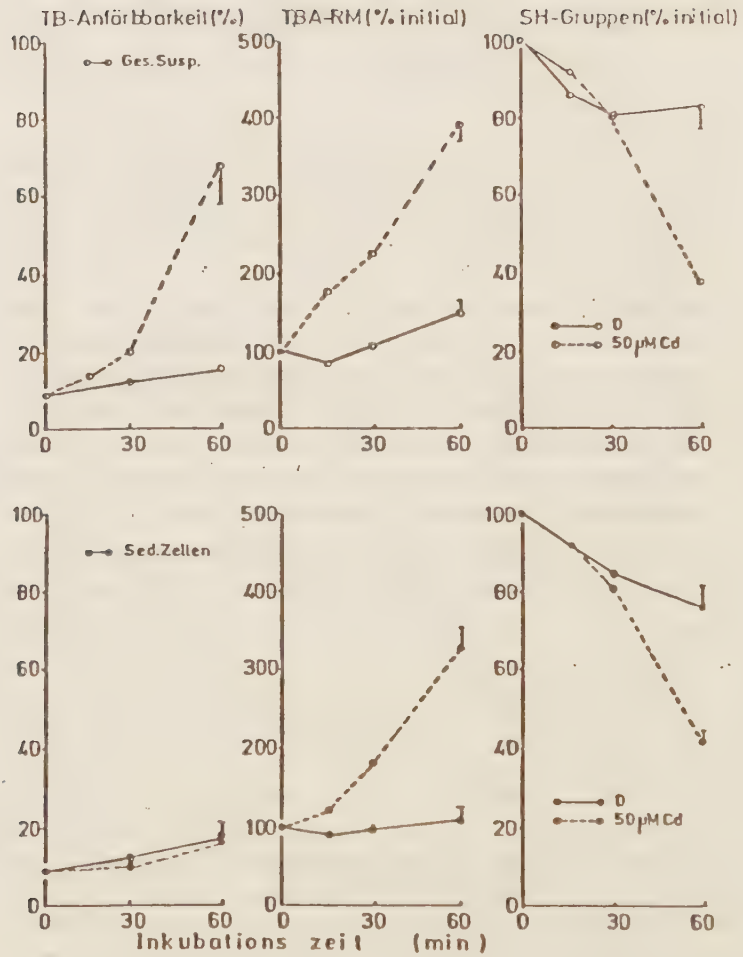


Abb.13: Einfluß von Cd auf die TB-Anfärbbarkeit, die Bildung TBA-reaktiven Materials und den SH-Gruppen-Gehalt in Hepatocyten gehungerter Ratten.

Die Bestimmung der Parameter erfolgte zu den angegebenen Zeiten in der Ausgangssuspension (Ges.Susp.; Abb.oben) oder in den gleichzeitig nach Abschnitt 3.5.4 sedimentierten resuspendierten Hepatocyten (Sed.Zellen; Abb.unten). Initialwerte: Suspension/ Resuspendierte Zellen: TBA-RM, 0.091 ± 0.021 / 0.073 ± 0.009 nmol/10^6 Zellen; SH-Gruppen: 24.0 ± 4.0 / 24.2 ± 0.8 nmol/10^6 Zellen. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-6 Präparationen.

der GSH-Gehalt vermindert, obwohl die TB-Anfärbbarkeit -als Ausdruck der Membran-Intaktheit- (noch) nicht vom Kontroll-Niveau unterscheidbar ist.
Es ist berichtet worden, daß die CCl_4-abhängige LPO mit dem Grad der Membranschädigung in der Hepatocyten-Suspension stimuliert wird (101). Wie Abb.14 zeigt, kann dies für Hungertier-Hepatocyten bestätigt werden. Die Cd-abhängige Bildung TBA-reaktiven Materials wird jedoch unter diesen Bedingungen nicht verstärkt.
Diese Befunde zeigen, daß Cd wohl einen Einfluß auf die Membran-Integrität der Zelle ausübt (siehe Einleitung Abb.1; Abb.12, Tab.2), dieser Effekt jedoch wahrscheinlich nicht direkt mit seiner LPO-stimulierenden Wirkung in Verbindung steht. Ebenso scheint ein Zusammenhang mit der Cd-abhängigen GSH-Abnahme fraglich. Die Ergebnisse weisen zudem darauf hin, daß die Mechanismen der CCl_4-stimulierten LPO von denen der durch Cd bewirkten LPO verschieden sind.

2. Einfluß vermehrter SH-Gruppen auf die Cd-abhängige LPO

Zellen synthetisieren Glutathion über den Cystathionin-Stoffwechselweg, wenn ihnen entsprechende Aminosäuren als Vorstufen zur Verfügung gestellt werden (32,46,51). Als besonders wirksam hat sich eine Kombination der Aminosäuren Methionin und Serin bewährt (51).
Wenn die Cd-bedingte LPO auf einer Erniedrigung des GSH-Gehalts der Zelle beruht -wie für andere giftigen Substanzen angenommen (37,38)-, sollte eine vermehrte intrazelluläre Bildung von GSH in Gegenwart von Methionin und Serin zu einer verminderten LPO führen, nicht zuletzt, weil dann das intrazellulär wirkende Cd durch das Nukleophil GSH vermehrt abgefangen würde (23). Tab.3 zeigt, daß Methionin und Serin -wie erwartet- den im Ablauf der Inkubation erniedrigten GSH-Gehalt in Kontroll- aber auch in Cd-behandelten Hepatocyten erhöht. Die Cd-bedingte Zunahme der TB-Anfärbbarkeit wird stark vermindert. Dennoch wird nicht -wie gefordert- die Cd-stimulierte LPO vermindert, sondern bleibt konstant (bei geringerer Aminosäure-Konzentration) oder wird sogar erhöht (Tab.3).

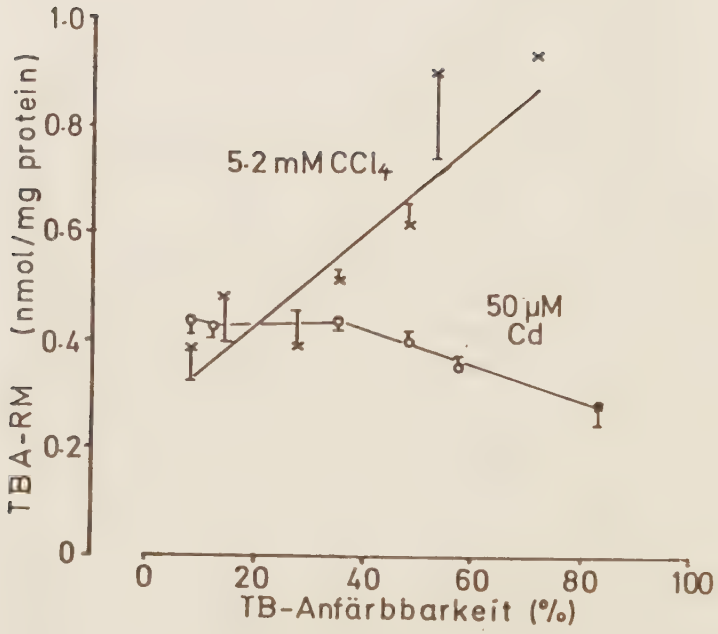


Abb.14: Cd- und CCl_4-stimulierte Bildung TBA-reaktiven Materials in Abhängigkeit von der initialen TB-Anfärbbarkeit

Kombinierte Zellsuspensionen (5-6 x 10^6 Zellen/ml) aus membranintakten und permeablen Hepatocyten (siehe Abb.9) wurden in geschlossenen Gefäßen mit 50 µM Cd oder 5.2 mM CCl_4 60 min bei 37°C inkubiert. Die CCl_4-abhängige Bildung TBA-reaktiven Materials nimmt linear mit der TB-Anfärbbarkeit in der Suspension zu; Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden R = 0.872. Jeder Wert ist ein Mittelwert aus mindestens 3 Präparationen mit wenigstens 3 Graden der TB-Anfärbbarkeit.

	Cd	Methionin	Serin	SH-Gruppen	GSH	GSH von SH	TBA-RM	TB-Anfärbbarkeit
	µM	mM	mM	nmol / mg		%	nmol/mg	%
t = 0				16.1 ± 2.3	16.1 ± 0.3	100.9 ± 1.9	0.108 ± 0.02	7.9 ± 2.2
t = 60	0	-	-	11.3 ± 1.4	11.2 ± 1.0	102.5 ± 7.9	0.167 ± 0.03	15.0 ± 1.5
	0	1	1	17.8 ± 2.4	15.6 ± 1.7	87.8 ± 9.4	0.169 ± 0.02	7.9 ± 9.4
	0	4	4	22.7 ± 2.7	16.5 ± 2.4	72.6 ± 9.7	0.316 ± 0.05	9.4 ± 1.3
	50	-	-	6.3 ± 0.7*	6.1 ± 0.8	97.4 ± 5.2^{ns}	0.445 ± 0.03	66.1 ± 10.7
	50	1	1	16.5 ± 1.7^{ns}	10.9 ± 0.5	65.8 ± 3.6*	0.593 ± 0.03	17.9 ± 4.0
	50	4	4	21.3 ± 3.4^{ns}	12.6 ± 0.2	58.8 ± 1.1^{ns}	0.705 ± 0.09	11.7 ± 2.7

Tab.3: Einfluß von Methionin und Serin auf Cd-abhängige Änderungen des SH-Gruppen- und GSH-Gehalts, der Bildung TBA-reaktiven Materials und der TB-Anfärbbarkeit in Hepatocyten gehungerter Ratten

Hepatocyten wurden 10 min vor Zugabe von physiol.NaCl oder Cd (50 µM Endkonz.) mit Methionin und Serin in den angegebenen Endkonzentrationen vorinkubiert. Die Bestimmung der Parameter erfolgte in der Zellsuspension zu Inkubationsbeginn (t=0) und nach weiteren 60 min Inkubation (t=60). Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen. Die Werte sind mit $p < 0.01$ (*) signifikant unterschieden von Kontrollwerten ohne Cd; ns = nicht signifikant.

Thor et al. (46) haben gezeigt, daß Methionin einen guten Schutz der Zellmembran vor der Giftigkeit von Brombenzol bewirkt, gekennzeichnet durch eine verminderte NADH-Penetration in Hepatocyten während der Inkubation mit diesem Zellgift. Meine Untersuchungen bestätigen eine solche schützende Wirkung der Aminosäure auch gegen die Zellmembranschädigung durch Cd. Grundlage des Schutzes mag hierbei -ebenso wie in der oben angegebenen Studie (46)- die Bildung von Cystein und Glutathion sein. Vermutlich wird Cd durch diese Substanzen von einem weitergehenden Angriff auf empfindliche membranäre Strukturen, z.B. SH-Gruppen von Membranproteinen (25), abgehalten. Die Stimulation der Lipidperoxidation durch das Schwermetall erscheint nach meinen Ergebnissen eher unabhängig vom intrazellulären GSH-Gehalt zu sein.

3. Zur Wirkung einer Hemmung der Cd-LPO auf die Cd-bedingten Änderungen des GSH-Gehalts und der Membranpermeabilität

Falls Lipidperoxidation andererseits die Voraussetzung für die Zellschädigung (33,36,39,40) auch durch Cd darstellt, sollte die Verminderung der LPO durch antioxidativ wirksame Substanzen zu einer Hemmung der Cd-Wirkung auf den GSH-Gehalt und die Membranpermeabilität führen.

Inkubation der Hepatocyten mit (+)-Cyanidanol-3 , einem bekannten Antioxidanz (38,41,106), führt erwartungsgemäß zu einer starken Herabsetzung der durch Cd stimulierten LPO (Abb.15). Es besitzt jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Cd-bedingten Änderungen der Membran-Integrität und des GSH-Gehalts. Weniger potent (gemessen an der eingesetzten Konzentration) aber ebenso antioxidativ wirksam wie (+)-Cyanidanol-3 ist Paracetamol (Acetaminophen) (Abb.15), ein Analgetikum (46,50). Sein hemmender Einfluß auf die LPO in Jodacetamid-(37) und Chloroform-vergifteten Hepatocyten (39) ist ebenfalls nachgewiesen. Paracetamol beeinflußt jedoch nicht die Cd-abhängige Membranpermeabilitäts-Zunahme oder die GSH-Abnahme.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Hemmung der LPO nicht zu einer Verminderung der Cd-Toxizität, gemessen an den genannten Parametern, für Hepatocyten führt.

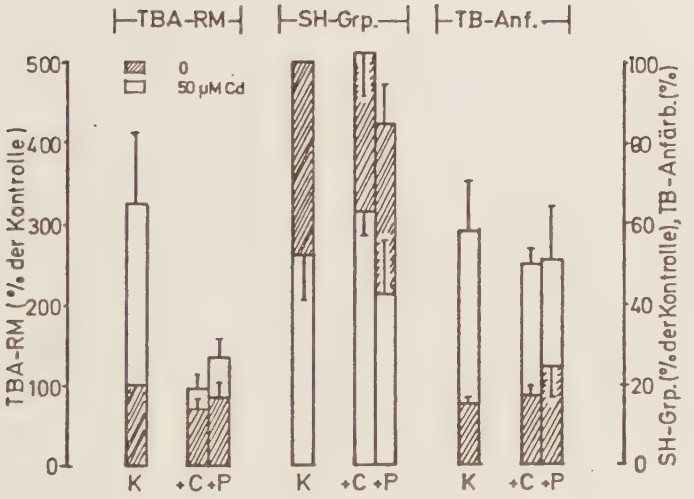


Abb.15: Einfluß von (+)-Cyanidanol-3 und Paracetamol auf die Cd-abhängige Bildung TBA-reaktiven Materials, auf den SH-Gruppen-Gehalt und die TB-Anfärbbarkeit in Hepatocyten gehungerter Ratten

Hepatocyten wurden ohne (schraffierte Kolonnen) oder mit 50 µM Cd (offene Kolonnen) 60 min ohne Agens (K) oder in Gegenwart von 50 µM (+)-Cyanidanol-3 (C) oder 2.5 mM Paracetamol (P) inkubiert. 100% TBA-RM und SH-Gruppen: siehe Tab.3. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-5 Präparationen.

Die eingangs des Kapitels gestellten Fragen müssen also verneint werden: die Cd-stimulierte Lipidperoxidation bewirkt weder eine Zunahme der Membranpermeabilität, noch vermehrt die Zellmembranschädigung die LPO; auch vermindert eine erhöhte Membran-Intaktheit nicht die Stimulation der LPO; die Lipidperoxidation ist offensichtlich nicht Ursache der GSH-Abnahme, noch kann sie durch GSH-Erhöhung herabgesetzt werden. Die Wirkungen von Cd auf LPO, Membranpermeabilität und GSH-Gehalt stehen wahrscheinlich - entgegen den in der Einleitung geäußerten Annahmen (Abb.1)- nicht direkt miteinander in Verbindung. Dies bestätigt die bereits in Untersuchungen an Hepatocyten gefütterter Ratten erhobenen Zweifel an der ursächlichen Beziehung der Lipidperoxidation zur schwermetall-induzierten Zellschädigung (18,41-43) auch in Hungertier-Hepatocyten, deren höhere Empfindlichkeit gegenüber Cd offensichtlich nicht auf einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber der Cd-stimulierten Bildung von Lipidperoxiden beruht. Darüberhinaus stellen meine Untersuchungsergebnisse die für andere LPO-auslösende Agenzien postulierte strenge Beziehung zwischen GSH-Abnahme und LPO-Stimulation (36-39) hinsichtlich der Cd-Giftigkeit in Frage.

4.5 Bedeutung der Cadmium-abhängigen Lipidperoxidation in der Cadmium-bedingten Beeinträchtigung intrazellulärer Prozesse in Hepatocyten gehungerter Ratten

Wie in Kapitel 4.3 dargelegt, wird die Lipidperoxidation bereits in Gegenwart von 10 µM Cd stimuliert, einer Konzentration, die noch keinen Effekt auf die TB-Anfärbbarkeit der Hepatocyten besitzt (Abb.12). Untersuchungen von Cd-behandelten Hepatocyten gehungerter Ratten in Gegenwart des Komplexbildners EDTA sowie mit metallothionein-gebundenem Cd haben zu einem ähnlichen Resultat geführt: die Stimulation der LPO erfolgt, bevor die strukturelle Intaktheit der Zellen, gemessen mit der TB-Anfärbmethode, vermindert wird (hier nicht näher dargestellt). Dies läßt vermuten, daß der Zelluntergang zwar nicht die Folge der Lipidperoxidation, wohl aber auf Cd-Wirkungen zurückzuführen ist (s.Abb.1), die u.a. auch zur LPO führen. 10 µM Cd erscheinen nicht harmlos für die Zellen. Einmalige Dosen von Cd im Bereich von 1-10 µmole/Ratte führten bereits zu ultrastrukturellen Änderungen von Zellorganellen (10,11). Es ist anzunehmen, daß die Schädigung funktioneller Zusammenhänge in der Zelle durch Cd frühzeitiger eintritt als seine Wirkung auf die Zellmembran (8). So bewirken schon nanomolare Konzentrationen des Metalls erhebliche Störungen der Funktion isolierter Mitochondrien (58-61). LPO zeigt vermutlich schon intrazelluläre Schäden durch Cd an, bevor sie in Form einer Permeabilitätsänderung der Zellmembran manifest werden.

Zur Abgrenzung der möglichen Zielorganellen für Cd wurde zunächst die Verteilung des Metall in den Zellkompartimenten untersucht.

4.5.1 Verteilung von Cadmium in den Zellkompartimenten

Hepatocyten wurden mit 25 µM Cd inkubiert, einer Konzentration, die noch keinen Einfluß auf die Membranpermeabilität hat (Kapitel 4.3, Abb.12). In Abb.16 sind die nach Differentialzentrifugation in den Zellkompartimenten gemessenen Cd-Konzentrationen wiedergegeben. In Übereinstimmung mit Parenchymzell-Kulturen (99) und in-vivo Langzeitexperimenten (56,57,98 u.a) findet sich Cd auch

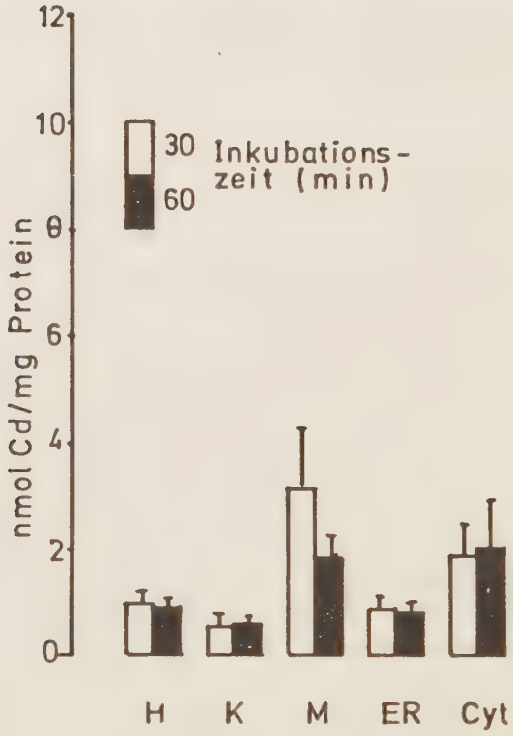


Abb.16: Verteilung von Cd in den Zellkompartimenten

Hepatocyten gehungerter Ratten wurden 30 und 60 min in Gegenwart von 25 µM Cd und radioaktivem Cd (Cd-109, 63.5 nCi/ml) inkubiert. Die Bestimmungen erfolgten in den sedimentierten,resuspendierten und homogenisierten Zellen (H) und den nach Differentialzentrifugation aus ihnen gewonnenen Fraktionen der "Kerne" (K, 800 x g), der Mitochondrien (M, 9000 x g), des Endoplasmatischen Retikulums (ER, 105000 x g) und des Cytosols (Cyt, 105000 x g Überstand) (s. Kapitel 3.11 und 3.13). Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen.

im Akut-Versuch mit isolierten Hepatocyten in besonders starkem Maße in der cytosolischen und mitochondrialen Fraktion. Nach meinen Befunden beträgt der prozentuale Anteil von ^{109}Cd an der Gesamt-Aktivität in den Zellen nach 30 min Inkubation im Cytosol 40-60%, in den Mitochondrien 7-10% und in der Mikrosomen-Fraktion (Endoplasmatisches Retikulum) 0.5%.

Da die Konzentration des Metalls mit dem Ausmaß der Zellschädigung zusammenhängt (Kapitel 4.3) (98), weist die Kompartimentierung auf primär cytosolische und/oder mitochondriale Angriffspunkte für Cd hin.

In den folgenden Kapitel soll daher der Einfluß von Cd auf Vorgänge, die an cytosolische und/oder mitochondriale Strukturen gebunden sind (Lipidperoxidabbau durch das Glutathion-Peroxidase-System, Kapitel 4.5.2; Energie-Bereitstellung in der Zelle, Kapitel 4.5.3; Schwellen und Rekontraktion von Mitochondrien, Kapitel 4.5.4) untersucht werden mit dem Ziel, die Bedeutung der Lipidperoxidation und möglicherweise die ursächliche Verantwortung der Cd-abhängigen LPO für die Cd-Wirkung auf die oben genannten Prozesse zu klären. Hierbei soll auch der Frage nachgegangen werden, worauf die in den vorangegangenen Kapiteln aufgezeigte Cd-Wirkung auf Hepatocyten gehungerter Ratten (d.h. Lipidperoxidationszunahme und GSH-Abnahme, Abb.12) zurückgeführt werden kann.

4.5.2 Einfluß von Cadmium auf das Glutathion-Peroxidase-System in Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten und dessen Beziehung zur Lipidperoxidation

Ein Schutzmechanismus der Zelle gegen das vermehrte Auftreten von Lipidperoxiden (Abb.2) stellt das Glutathion-Peroxidase- System dar (Einleitung, Abb.3) (34). Es umfaßt die im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix lokalisierten Enzyme Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) (32,52-55,63,107) und die Glutathion-Reduktase (28, 32) sowie das NADPH-generierende Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (29,30,32).

Es ist nicht anzunehmen, daß Cd direkt Lipidperoxidation hervorruft. So besitzt es z.B. nicht die Eigenschaft von Eisen-Ionen (33,34,64), durch Änderung des Reduktionszustands Elektronen zur Initiierung der LPO zur Verfügung zu stellen. Vorzustellen ist eher ein indirekter Effekt von Cd auf Enzyme, die im hier untersuchten Beispiel am Abbau von Lipidperoxiden beteiligt sind. So ist ein Überladen bzw. Vermindern der Kapazität der GSH-Px mit der Lipidperoxidation in Verbindung gebracht worden (37,52). Eine Cd-bedingte Hemmung dieses Enzyms, wie in in-vitro-Versuchen nachgewiesen (40,53), könnte die Stimulation der LPO durch Cd erklären. Die Literaturangaben über einen Hemmeffekt von Cd sind jedoch widersprüchlich (53-55). Es sollte daher zunächst geklärt werden, ob eine Hemmung der GSH-Px in Hepatocyten für die Cd-bedingte LPO verantwortlich ist. Die Bereitstellung von GSH und NADPH ist eng mit dem Lipidperoxidabbau verknüpft (Abb.3). Eine weitere Überprüfung des Einflusses von Cd auf die NADPH-generierenden Enzyme G6PDH, Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) und Malat Enzym erscheint daher erforderlich. Hierdurch soll ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Cd-Wirkung auf Enzyme des GSH-Px-Systems mit der LPO und der GSH-Abnahme in Hepatocyten gehungerter Tiere geklärt werden.

Die in Abb.17 wiedergegebenen experimentellen Daten in Hungertier-Hepatocyten zeigen, daß -im Gegensatz zu Befunden am isolierten Enzym (53)- Cd während 60 min Inkubation keine Hemmung der GSH-Px bewirkt. Ebenso unwirksam ist Cd gegenüber diesem Enzym in

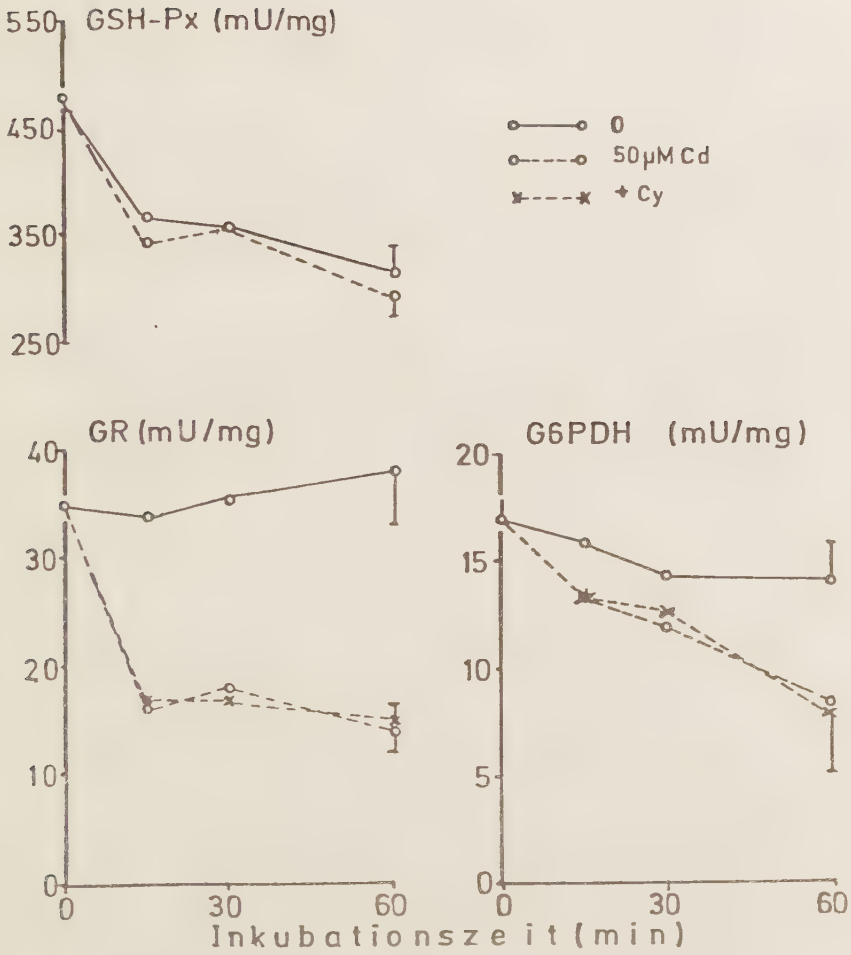


Abb.17: Einfluß von Cd auf die GSH-Peroxidase, die Glutathion-Reduktase und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Hepatocyten gehungerter Ratten

Hepatocyten wurden mit oder ohne 50 µM Cd inkubiert; den Cd-Inkubaten wurden in Parallel-Ansätzen 50 µM (+)-Cyanidanol-3 (Cy) hinzugegeben (Endkonz.). GR = Glutathion-Reduktase. Die Bestimmungen erfolgten in sedimentierten Zellen (Kapitel 3.4.5). Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen

Hepatocyten gefütterter Tiere (Abb.20). Meine Ergebnisse ergänzen somit Beobachtungen an nicht zellulären Systemen (54,55), denen zufolge die GSH-Px wohl durch andere Metalle wie Quecksilber (Hg^{2+}) oder Silber (Ag^{+}) (54), nicht jedoch durch Cd in ihrer Aktivität behindert wird.

Im Gegensatz zu den unter optimierten Bedingungen durchgeführten Enzym-Bestimmungen könnte eine intrazelluläre Herabsetzung der der GSH-Px-Aktivität -als vermutete Basis der LPO (37,52)- durch eine eingeschränkte Verfügbarkeit von GSH (107) und/oder NADPH (29) verursacht werden.

GSH wird über die Glutathion-Reduktase-(GR)-Reaktion geliefert (Einleitung, Abb.3). Cd führt zu einer ausgeprägten Abnahme der GR-Aktivität in der Zelle (Abb.17): 50 µM Cd setzen bereits nach 15 min Inkubation die Enzymaktivität um ca 50% herab. In gleicher Weise werden auch Hepatocyten gefütterter Ratten betroffen (Abb. 20). Diese starke Reaktion der Glutathion-Reduktase mag ihre Ursache in einer erhöhten Empfindlichkeit des Enzyms auf Grund des Vorhandenseins von 8 freien SH-Gruppen pro Molekül (31) haben, die prinzipiell durch Cd belegt werden können.

Die Reduktion von GSSG zu GSH benötigt das Co-Substrat der Glutathion-Reduktase-Reaktion, NADPH (29,107). Die NADPH-generierenden Enzyme G6PDH (in der Hauptsache) sowie Isocitrat-Dehydrogenase und das Malat-Enzym gleichen in der Regel eine Verminderung des Reduktionszustands der Pyridin-Nukleotide (z.B. infolge der Reduktion von GSSG) durch eine vermehrte Aktivität aus (73,108). Tab.4 zeigt, daß Cd auch den Pyridin-Nukleotid Status der Zelle beeinflußt: sowohl der reduzierte Anteil am Gesamtgehalt der Nukleotide als auch der NADPH-NADP-Quotient werden durch Cd während der Inkubation weniger stark erhöht als in der Kontrolle. Diese Befunde sind mit einer hohen Abweichung der Meßwerte in Gegenwart des Metalls behaftet. Sie lassen daher keine signifikanten Unterschiede, wohl aber die Tendenz der Cd-Wirkung erkennen. Der Trend wird jedoch durch das Verhalten der Enzymaktivitäten während der Inkubation bekräftigt (Abbildungen 17,18): sowohl die Aktivität der G6PDH als auch die der ICDH und des Malat Enzyms werden durch Cd (etwa in dieser Reihenfolge) zeit- und konzentrations-

Inkubationszeit (min)	NADPH nmol/mg Protein	NADP nmol/mg Protein	NADPH / NADPH + NADP	NADPH / NADP
0	3.71 ± 0.16	1.22 ± 0.44	0.711	3.04
30	4.07 ± 0.17	1.07 ± 0.27	0.814	3.80
30 + Cd	4.66 ± 0.92	1.44 ± 0.73	0.755	3.24

Tab.4: NADP(H)-Status in Hepatocyten gehungerter Ratten in Gegenwart von Cd

Hepatocyter wurden 30 min in Ab- oder Anwesenheit von 100 µM Cd inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 6-7 Präparationen

Inhibitor	2'AMP	Pyridoxalphosphat
Inhib.Enzym	ICDH	G6PDH
SH Gruppen (%)	81.2 ± 5.7	3.4 ± 2.5

Tab.5: Einfluß von Inhibitoren NADPH-generierender Enzyme auf den SH-Gehalt in Hepatocyten gehungerter Ratten

Hepatocyten wurden 30 min in Gegenwart von 100 µM Cd inkubiert. Inhibitoren (5 mM Endkonz.) wurden zu Inkubationsbeginn hinzugesetzt. Die SH-Gruppen-Konzentration nach 30 min ist in Prozent der 100 µM Cd-Kontrolle (= 11.8 ± 1.7 nmol SH/mg Protein) angegeben.

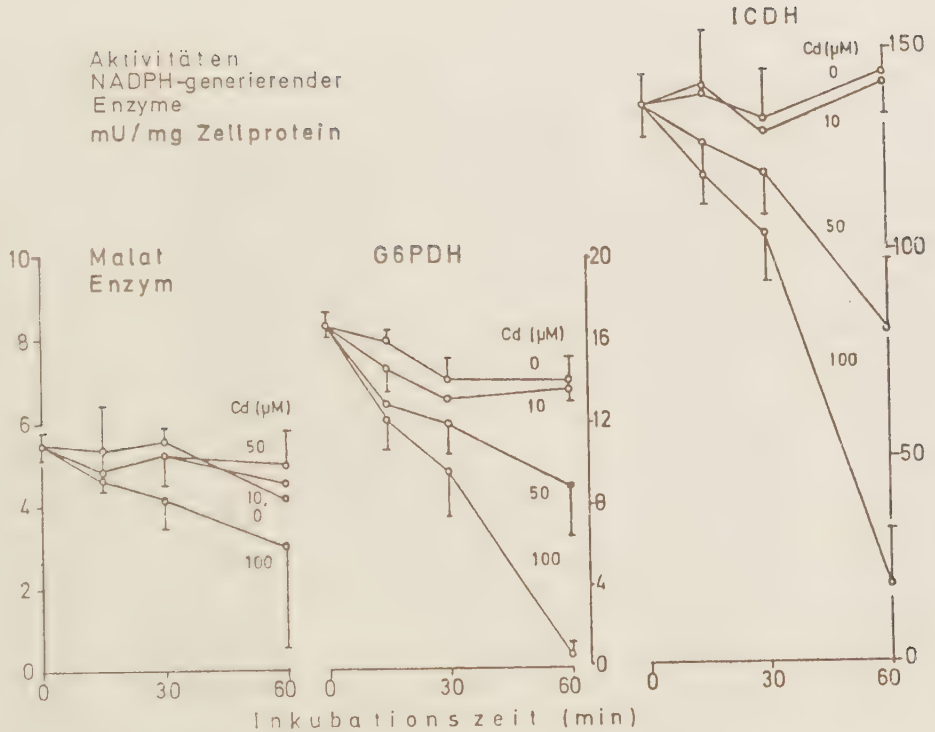


Abb.13: Einfluß von Cd auf die Aktivitäten NADPH-generierender Enzyme in Hepatocyten gehungerter Ratten

Hepatocyten wurden in Gegenwart der angegebenen Cd-Konzentrationen inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 4-6 Präparationen.

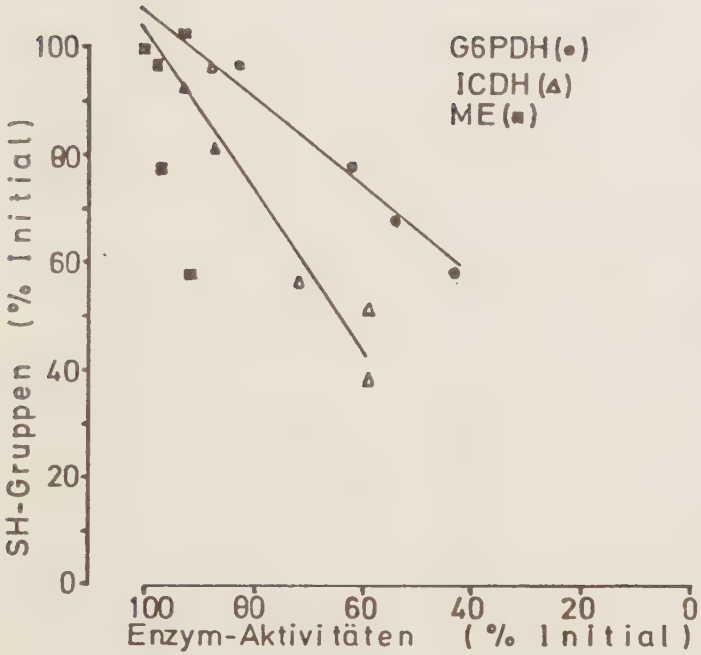


Abb.19: Abhängigkeit der SH-Gruppen-Konzentration von den Aktivitäten der G6PDH, der ICDH und des Malat Enzyms in Hepatocyten gehungerter Ratten

Hepatocyten wurden 60 min in Gegenwart von 50 µM Cd inkubiert. Die nach 15, 30, 45 und 60 min bestimmten Aktivitäten in Prozent des Zeit-Null-Wertes sind gegen die zur selben Zeit erhaltenen SH-Konzentrationen in Prozent des Zeit-Null-Wertes aufgetragen. 100% entsprechen 17.5 (G6PDH), 134.5 (ICDH) und 5.5 mU/mg Protein (Malat Enzym) sowie 16.1 nmol SH/ mg Protein.

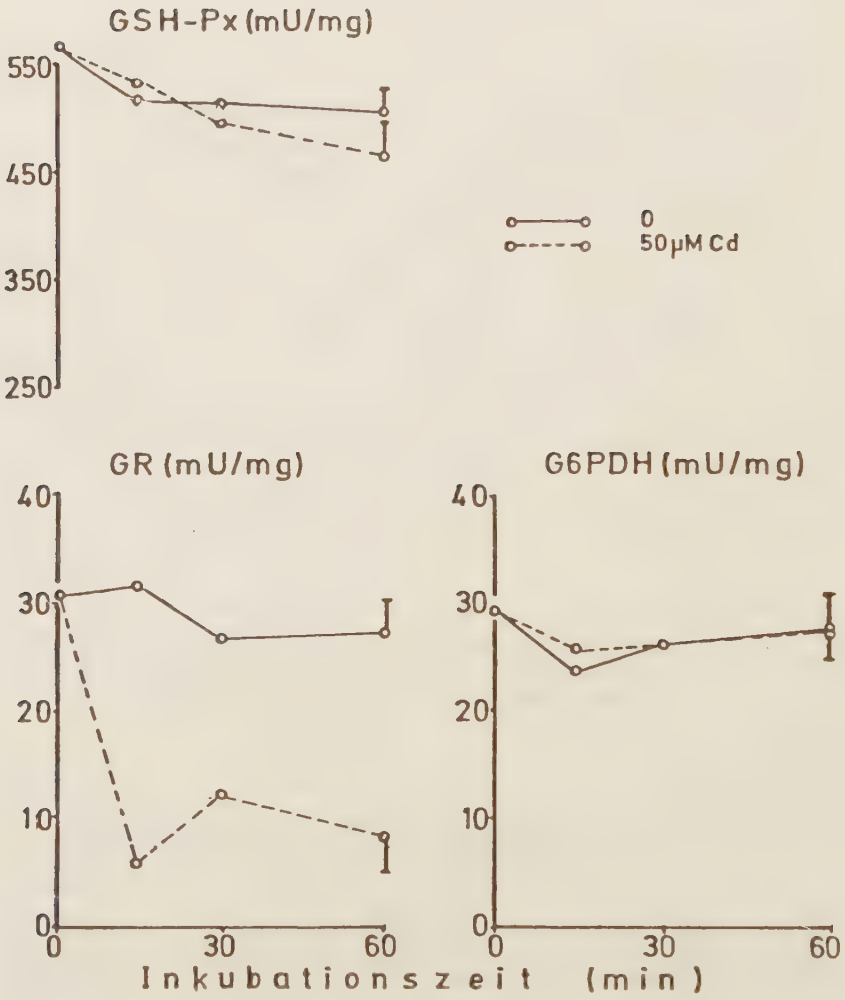


Abb.20: Einfluß von Cd auf die GSH-Peroxidase, die Glutathion-Reduktase und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Hepatocyten gefütterter Ratten

Hepatocyten wurden mit oder ohne 50 µM Cd inkubiert (s.Abb.17). Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen.

abhängig in Hepatocyten gehungerter Ratten erniedrigt. Dies steht in Einklang mit der in Leber- und Nervenhomogenaten beschriebenen Hemmung der G6PDH (29), der allgemeinen Empfindlichkeit der ICDH gegenüber Schwermetallen (94) und der Hemmung des Malat Enzyms durch Kupfer (Cu^{2+}) und Hg^{2+} (95), beides Metalle, die dem Cd ähnliche Stoffwechselstörungen hervorrufen (7,23). Im Gegensatz hierzu bewirkt Cd jedoch in Hepatocyten gefütterter Ratten keine Hemmung der G6PDH (Abb.20).

Kontrollansätze, denen Cd im Testansatz der Enzym-Bestimmung zugegeben worden ist (Enkonz. 50 µM Cd), haben zu keinen Änderungen der Enzymaktivitäten geführt. Auch mehrstündige kalte Dialyse des 8000 x g Überstandes (Kapitel 3.10) brachte keine Reaktivierung der durch Cd gehemmten G6PDH. Dies läßt vermuten, daß die Hemmung der untersuchten Enzyme auf eine Cd-bedingte Schädigung der Enzym-Funktion zurückzuführen ist.

Eine Stimulation der LPO als Folge der sich aus diesen Enzymschädigungen (verminderter GSH-Gehalt,verminderte NADPH-Bereitstellung) ergebenden metabolischen Hemmung der GSH-Px kann aus diesen Ergebnissen jedoch ohne weiteres nicht abgeleitet werden: dies folgt aus dem unterschiedlichen Verhalten des GSH-Gehalts in Hepatocyten gehungerter und gefütterter Ratten bei gleichartig stimulierter LPO (Kapitel 4.3). Zudem wird die LPO bereits bei 10 µM Cd stimuliert (Abb.12), ohne daß der GSH-Gehalt der Zelle vermindert (Futtertiere) oder nennenswert beeinträchtigt wird (Hungertiere) (Abb.12), und ohne daß die Glutathion-Reduktase (nicht dargestellt) sowie die G6PDH gehemmt werden (Abb.18).

Der Aktivitätsverlust der Glutathion-Reduktase und der G6PDH könnte -wie für andere Enzyme angenommen (34)- durch Lipidperoxide bzw. deren Zerfallsprodukten (Einleitung, Abb.2) verursacht sein. (+)-Cyanidanol-3 vermindert jedoch nicht die Cd-Wirkung auf diese Enzyme (Abb.17). Auch spricht das Fehlen einer G6PDH-Inaktivierung in Hepatocyten gefütterter Ratten (Abb.20) trotz Cd-stimulierter LPO (Abb.12) gegen einen solchen indirekten Einfluß auf die Enzymaktivität.

Die Cd-abhängige Lipidperoxidation erscheint nach diesen Ergebnissen

daher weder als Folge noch als Mittler der Cd-Wirkung auf Enzyme des GSH-Px-Systems.

Der GSH-Gehalt in Cd-belasteten Hepatocyten gehungerter Ratten nimmt merklich erst nach 30 min Inkubation ab (Abbildungen 12, 13),also nach Schädigung der Glutathion-Reduktase (Abb.17) und bei gerade erst erkennbaren Aktivitätsminderungen der G6PDH und der ICDH (Abbildungen 17,18). Dies läßt vermuten, daß die Schädigung NADPH-generierender Enzyme mit der ebenfalls nur in Hepatocyten gehungerter Ratten beobachtbaren Cd-abhängigen GSH-Abnahme (Abb.12) in Zusammenhang steht. Abb.19 zeigt, daß der GSH-Gehalt mit der G6PDH- und der ICDH-Aktivität verknüpft ist, nicht jedoch mit der Aktivität des Malat Enzyms (dessen Rolle hier nicht weiter geklärt werden kann). Eine Hemmung der G6PDH, nicht jedoch der ICDH, führt in Gegenwart von Cd zu einer verstärkten GSH-Abnahme (Tab.5). Dies unterstreicht die Rolle der G6PDH als hauptsächlichen NADPH-Lieferanten der Zelle (108); die ICDH mag eine gewisse Bedeutung im mitochondrialen Metabolismus von GSH besitzen (107), ihre physiologische Reaktion ist jedoch eher in der Bildung von Isocitrat als in der Bereitstellung von NADPH zu sehen (94,108).

Die in Hepatocyten gehungerter Ratten beobachtete Cd-abhängige GSH-Abnahme beruht somit wahrscheinlich auf einer Kombination schädigender Effekte von Cd, die u.a. die Glutathion-Reduktase (Hemmung der Reduktion von GSSG) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Hemmung der NADPH-Bereitstellung) betreffen. Hepatocyten gefütterter Tiere mögen dagegen die Reduktion von GSSG bei fortwährendem Angebot von NADPH durch die G6PDH auch auf einem erniedrigten Niveau der Reduktase-Aktivität fortführen können, so daß keine GSH-Abnahme erfolgt.

Der Befund, daß die Lipidperoxidation nicht zur Enzyminaktivierung beiträgt und damit auch nicht (indirekt) für die GSH-Abnahme in Hepatocyten gehungerter Ratten verantwortlich ist, unterstützt zudem die in Kapitel 4.4 erhobene Annahme des fehlenden Zusammenhangs zwischen GSH-Gehalt und LPO in Gegenwart von Cd.

4.5.3. Einfluß von Cadmium auf den Energie-Status, den O_2-Verbrauch und den Lactat-Pyruvat-Quotienten in Hepatocyten gehungerter Ratten; Beziehung zur Lipidperoxidation

In isolierten Mitochondrien hemmt Cd bereits in nanomolaren Konzentrationen die oxidative Phosphorylierung (16,23,58-61). Auf zellulärer Ebene ist ein solcher Effekt von Cd bisher nur an Tumorzellen (16) und Makrophagen (27) beschrieben worden. Die im Kompartiment "Mitochondrion" nach Cd-Belastung von Hepatocyten gehungerter Ratten gemessene hohe Cd-Konzentration (Kapitel 4.5.1) läßt jedoch vermuten, daß mitochondriale Prozesse erkennbar auch in Hepatocyten durch Cd betroffen werden. Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß Lipidperoxidation nicht als Parameter der strukturellen (Zellmembran-) Intaktheit der Hepatocyten anzusehen ist (Kapitel 4.3 und 4.4). Möglich erscheint dagegen ein direkter Zusammenhang der LPO mit der funktionellen Intaktheit der Zellen, die insbesondere die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien beinhaltet. Grundlage dieser Annahme ist die Beobachtung, daß verschiedenste Agenzien, die zu einer Störung der Atmungsketten-Funktion führen, auch Peroxid-Bildung bzw. die Stimulation der LPO bewirken (63,64,107). So ist vorgeschlagen worden, daß die Giftigkeit von Quecksilber (Hg^{2+}), das ebenso wie Cd in Hepatocyten Lipidperoxidation stimuliert (41-43), auf einer Störung der Mitochondrien-Funktion durch dieses Metall beruht (115).

Es sollen daher im folgenden die nachstehenden Fragen geklärt werden:

1. Welche Wirkungen entfaltet Cd in der Zelle, die auf eine Änderung der Mitochondrien-Funktion schließen lassen ?
2. In welchem Zusammenhang steht die Cd-abhängige LPO zu diesen Wirkungen ?

Zur Beantwortung dieser Fragen wird der zelluläre Energie-Status, der O_2-Verbrauch sowie der Lactat-Pyruvat-Quotient der Zellen untersucht.

1. Einfluß von Cd auf die Mitochondrien-Funktion in Hepatocyten

In Tab.6 sind die zu Inkubationsbeginn (nach 10 min Vorinkubation der Zellen, Kapitel 3.4.1) in sedimentierten Hepatocyten bestimmten Parameter des zellulären Energie-Status zusammengefaßt. Ebenso wie der Gesamt-Adenin-Nukleotid-Gehalt entsprechen die einzelnen Konzentrationen von ATP, ADP und AMP den Literaturangaben (20,76).

ATP	19.1 ± 2.5	nmol/mg Protein (7)
ADP	4.6 ± 0.5	nmol/mg Protein (7)
AMP	1.4 ± 0.3	nmol/mg Protein (7)
Summe AXP	24.9 ± 2.6	nmol/mg Protein (7)
ATP/ADP	4.0 ± 0.4	(7)
ATP/AMP	13.1 ± 3.6	(8)
Energie-Ladung	0.843 ± 0.021	(7)

Tab.6: Energie-Status der Hepatocyten gehungerter Ratten zu Inkubationsbeginn

Angegeben sind Mittelwerte ± Sx aus (n) Präparationen. Die Adenylat Energie Ladung berechnet sich nach (109) aus (ATP + ADP/2)/(Summe AXP)

	O_2-Verbrauch in nmol/mg min nach		
	0	5	30 min
Kontrolle	10.67 ± 1.7	12.95 ± 1.6	12.96 ± 0.7
+50 µM Cd		11.00 ± 1.3	7.70 ± 2.8

Tab.7: Einfluß von Cd auf die O_2-Verbrauchsrate isolierter Hepatocyten

Hepatocyten wurden bei 37°C inkubiert. Der Sauerstoff-Verbrauch wurde mit einer Clark-Elektrode bestimmt (s. Kapitel 3.7.4).

Der ATP-ADP-Quotient in Hepatocyten 18 h gehungerter Ratten (Tab.6) liegt mit 4.0 ± 0.4 erwartungsgemäß zwischen den für Futtertier-Hepatocyten (2.7-4.7 (20); 5.07 (73); 4.37-5.1 (74); 3.66-4.1 (77)) und für Hepatocyten 48 h gehungerter Ratten angegebenen Werten (2.95 (70)). Entsprechend verhält sich der ATP-AMP-Quotient (20,70,76). Als Ausdruck des Füllungszustands des Systems mit energiereichen Verbindungen ist die Adenylat Energie Ladung (109) bestimmt worden (Tab.6), deren Betrag mit 0.843 ± 0.021 im Literaturvergleich (0.77 (70); 0.805 (77); 0.823-0.903 (20); 0.900 (76)) gut abschneidet.

Die aus diesen Angaben zu entnehmende, den Hepatocyten gehungerter Ratten adäquate, Ausgangslage des zellulären Energie-Status wird durch Cd in starkem Maße beeinträchtigt (Abbildungen 21,22). 10-100 µM Cd führen zu einer Verschiebung der Anteile von ATP, ADP und AMP an der Gesamt-Adenin-Nukleotid-Konzentration (Abb.21): infolge des Glucose-Angebots im Inkubat wird die ATP-Synthese initial stimuliert; Cd hemmt bereits diese Stimulation konzentrationsabhängig. Es folgt eine starke ATP-Abnahme bei gleichzeitiger Zunahme von ADP und -insbesondere in Gegenwart von 100 µM Cd- von AMP gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der ATP-ADP-Quotient, der ATP-AMP-Quotient sowie die Adenylat Energie Ladung werden durch Cd gegenüber der Kontrolle ebenfalls erniedrigt (Abb.22).

Der O_2-Verbrauch, dessen initiale Höhe den guten Funktionszustand der Hepatocyten dokumentiert (20,44,45,69,76,97) wird durch Cd ebenfalls vermindert (Tab.7). Bereits nach 5 min Inkubation mit 50 µM Cd ist die Hemmung tendentiell nachweisbar. Nach 30 min Inkubation beträgt der O_2-Verbrauch nur noch ca. 60% des Kontroll-Wertes.

Offensichtlich als Folge der Hemmung des O_2-Verbrauchs wird im Cytosol vermehrt Lactat gebildet. Dies kommt im Lactat-Pyruvat-Quotienten zum Ausdruck, der -weitgehend parallel zur Cd-bedingten Erniedrigung des Energie-Status (Abbildungen 21,22)- zeit- und konzentrationsabhängig durch das Metall erhöht wird (Abb.23). Ein gleichartiger Befund in Hepatocyten gefütterter Ratten in glucosefreier Lösung (18) unterstreicht, daß die starke Zunahme cytosolischer Reduktionsäquivalente unter den gegebenen Inkubationsbedin-

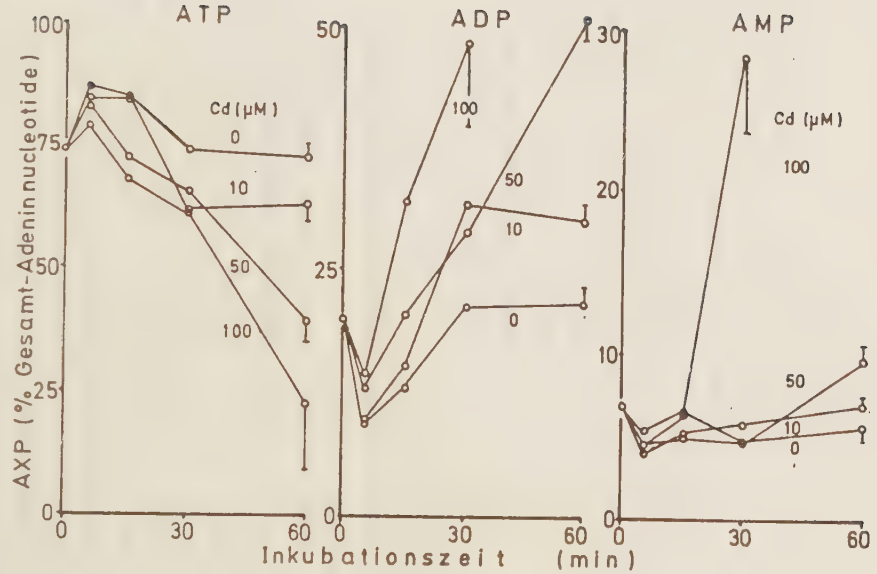


Abb.21: Einfluß von Cd auf ATP, ADP und AMP

Hepatocyten wurden in Gegenwart der angegebenen Cd-Konzentrationen inkubiert. Die prozentualen Anteile von ATP, ADP und AMP and der Gesamt-Adenin-Nukleotid-Konzentration sind aufgetragen; Absolutwerte für t=0 s.Tab.6. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 4-7 Präparationen.

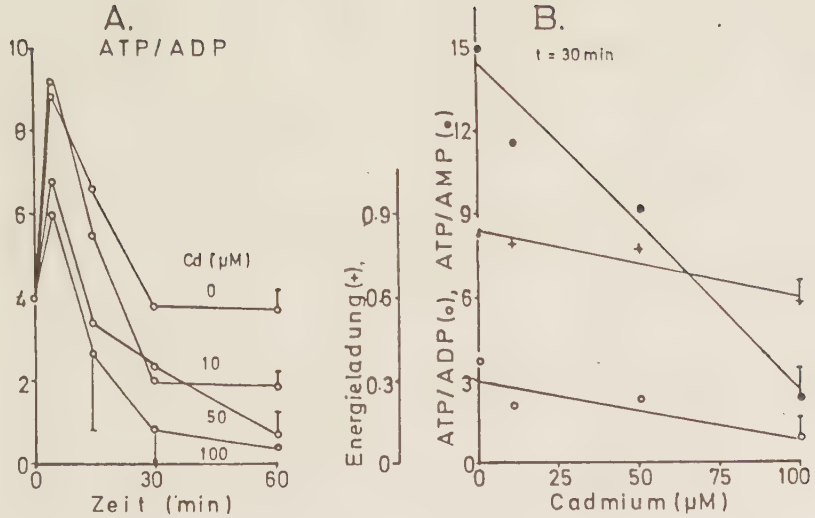
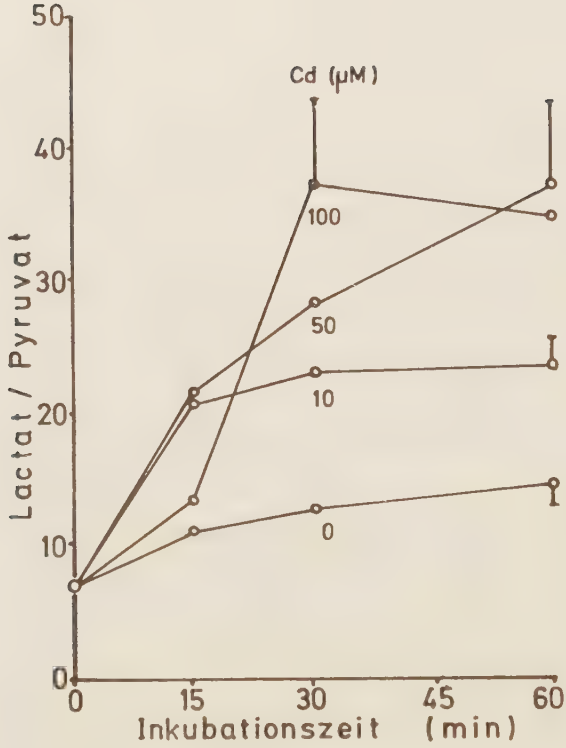


Abb.22: Einfluß von Cd auf den Energie-Status der Hepatocyten

A: Änderung des ATP-ADP-Quotienten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer; B: Dosis-Wirkungs-Beziehung für den ATP-ADP-Quotienten, den ATP-AMP-Quotienten und die Adenylat Energie Ladung nach 30 min Inkubation in Gegenwart der angegebenen Cd-Konzentrationen. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-5 Präparationen.



t= 30 min

Cd µM	Lactat / Pyruvat (nmol/mg)
100	87.7 ± 10.2
	2.4 ± 0.7
50	68.2 ± 4.3
	2.8 ± 0.3
10	64.9 ± 5.5
	3.0 ± 0.4
0	38.4 ± 3.4
	3.2 ± 0.3

Abb.23: Einfluß von Cd auf den zellulären Lactat-Pyruvat-Quotienten

Hepatocyten wurden in Gegenwart der angegebenen Cd-Konzentrationen inkubiert. Die Initial-Konzentrationen von Lactat und Pyruvat waren 15.4 ± 1.5 bzw. 2.7± 0.1 nmol/mg Protein. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 4-7 Präparationen.

gungen (Kapitel 3.3) nicht auf das Substrat Glucose zurückzuführen ist. Auch eine Aktivierung der Lactat-Dehydrogenase durch Cd mit der Folge eines vermehrten Durchsatzes von Pyruvat ist nach den in Kapitel 4.2 genannten Untersuchungen nicht anzunehmen.

Sowohl die Lactat-Bildung (29) als auch die Verminderung der O_2-Nutzung (29,110) in Gegenwart von Cd ist für Leber- und Hirnhomogenate beschrieben worden. Auch phagocytierende Zellen zeigen eine Hemmung des O_2-Verbrauchs (27). Meine Ergebnisse zeigen erstmals, daß Cd auch in isolierten Hepatocyten den Sauerstoffverbrauch behindert. Sie stehen somit in Einklang mit der für isolierte Mitochondrien berichteten Atmungshemmung in Gegenwart geringer Cd-Konzentrationen (57,58) und der in diesen Organellen beobachteten Abnahme energiereicher Verbindungen (59,60).Diese Befunde weisen auf eine Störung der mitochondrialen Funktion durch Cd bereits zu einem Zeitpunkt hin, zu dem die Hepatocyten noch zum größten Teil strukturell intakt sind, gemessen an der Zellmembranpermeabilität (Abbildungen 10,12).
Funktionell intakte Hepatocyten weisen in der Regel eine Zunahme des O_2-Verbrauchs nach Gabe des Entkopplers Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) um mindestens 50% des Ausgangswertes auf (45). 17 min nach Inkubationsbeginn wird die Atmung der Kontroll-Hepatocyten erwartungsgemäß durch CCCP (0.25 µM Endkonz.) um 104% (initial gemessen) bzw. 71% (während 3 min nach CCCP-Gabe gemessen) stimuliert. Mit 20 µM Cd inkubierte Hepatocyten zeigen jedoch nur eine Atmungsstimulation von 44% bzw. 47% über den Ausgangswert. Diese Hemmung der Entkoppler-stimulierten Atmung durch Cd -im Zusammenhang mit der bereits nach 5 min beobachtbaren tendentiellen Hemmung des endogenen O_2-Verbrauchs (Tab.7)- unterstreicht die frühzeitige Schädigung der funktionellen Intaktheit der Hepatocyten, und bestätigt deren vermutlichen Ursprung: die Cd-bedingte Störung der mitochondrialen Atmung.

2. Beziehung der Lipidperoxidation zur Mitochondrien-Funktion

Mitochondriale Membranen sind -im Gegensatz zur Zellmembran- reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (62,64), deren Peroxidation zur Verminderung der mitochondrialen Leistungsfähigkeit (64) und letztlich zur Beeinträchtigung der Zell-Integrität führen kann.

Wenn die Lipidperoxidation mit der Verminderung des zellulären Energie-Status einherginge, könnte die Lipidperoxidation als Parameter der verminderten funktionellen Intaktheit der Hepatocyten in Gegenwart von Zellgiften (wie Cd) angesehen werden.

Die in Abb.12 (Kapitel 4.3) wiedergegebene Bildung TBA-reaktiven Materials korreliert linear mit der Cd-Konzentration im Bereich von 10-125 µM Cd (Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden für 30 und 60 min Inkubation: R=0.957). Eine ebenfalls lineare Korrelation besteht zwischen der Cd-Konzentration und dem ATP-ADP-Quotienten (R=0.861), dem ATP-AMP-Quotienten (R=0.983) und der Adenylat Energie Ladung (R=0.956) (Abb.22). Die Beziehung zwischen dem ATP-ADP-Quotienten und der Bildung TBA-reaktiven Materials ist in Abb.24 dargestellt. Nach 30 und 60 min Inkubation korrelieren beide Parameter miteinander (R=0.907 bzw. R=0.930). Identische Resultate werden auch für die Beziehungen des ATP-AMP-Quotienten bzw. der Adenylat Energie Ladung mit der Cd-abhängigen Bildung TBA-reaktiven Materials erhalten (nicht dargestellt).

In Tab.8 ist die Hemmung der Mitochondrien-Funktion in Hepatocyten durch die Entkoppler CCCP und Dinitrophenol (DNP), durch Atractylosid, das die ATP-ADP-Translokation über die Mitochondrienmembran beeinträchtigt (78), und durch den Ca^{2+}-Transport-Inhibitor Ruthenium Rot dargestellt. Dies führt -wie zu erwarten ist- bereits ohne Zusatz von Cd zu einer, etwa in der angegebenen Reihenfolge der Substanzen, verstärkten Abnahme des zellulären Energie-Status, gemessen als ATP-ADP-Quotient bzw. Adenylat Energie Ladung. Dies bewirkt aber auch eine vermehrte Lipidperoxidation in den Zellen. Gleichzeitige Inkubation der Hepatocyten mit 50 µM Cd verstärkt beide Prozesse.

Diese Befunde weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Herabsetzung der funktionellen Integrität der Zelle und der Stimulation der Lipidperoxidation per se und speziell unter Cd-Belastung hin. Die Hemmung des O_2-Verbrauchs, wie sie in Gegenwart hoher Entkoppler- (58) und geringer Atractylosid-Konzentrationen (78), aber auch in Anwesenheit von Cd beobachtet wird (Tab.7) könnte mit der Stimulation der LPO in Verbindung stehen. Die zu frühen Inkubationszeiten (15 min) noch nicht vorhandene ATP/ADP-LPO-Relation (Abb.24)

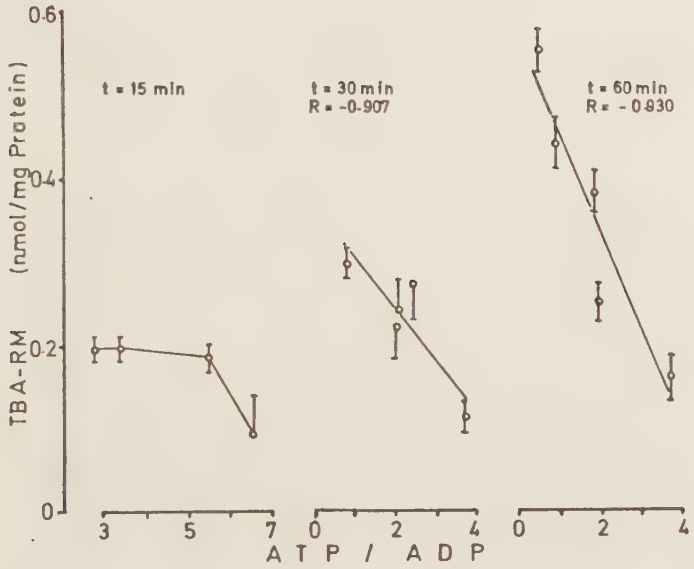


Abb.24: Beziehung zwischen ATP-ADP-Quotienten und der Cd-stimulierten Bildung TBA-reaktiven Materials

Relationen zwischen ATP-ADP-Quotienten und TBA-reaktivem Material wurden nach 15, 30 und 60 min Inkubation der Hepatocyten in Gegenwart unterschiedlicher Cd-Konzentrationen (s. Abb.21, 22) ermittelt. R = Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± aus 4-6 Präparationen.

Behandlung	ATP/ADP	Energie-Ladung	TBA-RM (nmol/g)
Kontrolle	3.78 ± 0.62	0.845 ± 0.022	115 ± 17
+ Cd-50	2.38 ± 0.23*	0.789 ± 0.083^{ns}	277 ± 65*
50 µM DNP	2.18 ± 0.34*	0.751 ± 0.031*	148 ± 14*
+ Cd-50	1.33 ± 0.71^{ns}	0.671 ± 0.032^{+}	352 ± 38^{ns}
50 µM ATR	1.43 ± 0.67*	0.656 ± 0.102*	164 ± 27*
+ Cd-50	0.24 ± 0.38^{+}	0.299 ± 0.030^{+}	365 ± 57^{+}
1 µM CCCP	2.16	0.724	214 ± 27*
+ Cd-50	0.61	0.549	395 ± 39^{+}
10 µM RuR	1.19	0.649	232 ± 16*
+ Cd-50	0.59	0.532	400 ± 27^{+}

Tab.8: Einfluß von Hemmern der Mitochondrien-Funktion auf den Energie-Status und die Bildung TBA-reaktiven Materials

Hepatocyten wurden in Gegenwart der Hemmer ohne oder mit 50 µM Cd (Cd-50) 30 min inkubiert; ATR: Atractylosid; RuR: Ruthenium Rot; Thiobarbitursäure-reaktives Material (TBA-RM) ist auf g Zellprotein bezogen. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-7 Präparationen; Werte ohne Sx sind Mittelwerte aus Doppelansätzen einer Präparation. Signifikante Unterschiede zu Kontroll- und Cd-Werten sind mit (*) bzw. (+) angegeben; ns = nicht signifikant.

Behandlung	ATP/ADP	Energie-Ladung	TBA-RM (nmol/g)
Kontrolle	3.66 ± 0.34	0.838 ± 0.009	167 ± 27
+ Cd-50	0.80 ± 0.55^{x}	0.607 ± 0.080^{x}	449 ± 33^{x}
50 µM C	3.62 ± 0.98^{ns}	0.819 ± 0.044^{ns}	164 ± 15^{ns}
+ Cd-50	0.58 ± 0.49^{ns}	0.509 ± 0.112^{ns}	214 ± 31^{+}
2.5 mM P	4.46 ± 0.88^{ns}	0.789 ± 0.112^{ns}	98 ± 12^{x}
+ Cd-50	0.82 ± 0.89^{ns}	0.562 ± 0.113^{ns}	192 ± 31^{+}
50 µM Zn	2.13 ± 0.19^{x}	0.749 ± 0.044^{x}	330 ± 32^{x}
+ Cd-50	0.52 ± 0.46^{ns}	0.456 ± 0.095^{+}	682 ± 16^{+}

Tab.9: Einfluß von (+)-Cyanidanol-3, Paracetamol und Zn auf den Energie-Status und die Bildung TBA-reaktiven Materials

Hepatocyten wurden in Gegenwart von (+)-Cyanidanol-3 (C), Paracetamol (P) und Zn in den angegebenen Konzentrationen ohne oder mit 50 µM Cd (Cd-50) 60 min inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-7 Präparationen. Signifikanzen s.Tab.8

läßt annehmen, daß beide Größen nicht direkt in Art einer Ursache-Wirkungs-Beziehung miteinander zusammenhängen. So ist die Lipidperoxidation selbst - wie auch für die Enzyme des Glutathion-Peroxidase-Systems beschrieben (Kapitel 4.5.2)-nicht Mittler der Cd-Wirkung auf den zellulären Energie-Status: Tab.9 verdeutlicht, daß die antioxidativ wirksamen Substanzen (+)-Cyanidanol-3 und Paracetamol wohl -wie in Abb.15 bereits gezeigt- die Cd-abhängige LPO vermindern, nicht jedoch die Cd-bedingte Erniedrigung des ATP-ADP-Quotienten und der Adenylat Energie Ladung verhindern.

Auch das essentielle Metall Zink (Zn^{2+}) -ein in der Literatur oft genannter Antagonist der schädigenden Wirkung von Cd (23,43,61,67)- vermag nicht den Cd-Effekt zu mindern (Tab.9). Zn bewirkt im Gegenteil selbst eine Erniedrigung des zellulären Energie-Status, stimuliert ebenfalls Lipidperoxidation und vermehrt die Cd-abhängige LPO entgegen den Angaben anderer Autoren (42,43). Die in Gegenwart von Zn erhaltene Relation von ATP/ADP zur LPO deckt sich mit der für Cd beschriebenen Relation (Abb.24). Hierin mag ebenfalls die auch für dieses Metall nachgewiesene Hemmung der Mitochondrien-Funktion (113) zum Ausdruck kommen.

Die eingangs geäußerte Vermutung, daß mitochondriale Prozesse auch in der (membranintakten) Zelle durch Cd gestört werden, hat sich im Ablauf der Untersuchungen des Energie-Status, des O_2-Verbrauchs und des Lactat-Pyruvat-Quotienten bestätigt. Die Mitochondrien scheinen sogar der primäre Angriffsort der Cd-Wirkung auf die Leberzelle zu sein. Die Lipidperoxidation ist demnach offenbar eine indirekte Folge eines solchen Effektes und weist somit auf eine Cd-bedingte Schädigung der funktionellen Integrität der Zelle hin.

4.5.4 Einfluß von Cadmium auf Struktur und Funktion isolierter Mitochondrien und dessen Beziehung zur Lipidperoxidation

Elektronenmikroskopische Aufnahmen weisen eine frühzeitige Schädigung der Mitochondrien durch Cd nach (10,11). Wie das vorangegangene Kapitel zeigt, ist auch im komplexen System der Leberzelle davon auszugehen, daß die Funktion der Mitochondrien durch Cd schon frühzeitig beeinträchtigt wird.
Struktur und Funktion der Mitochondrien sind eng miteinander verflochten, da die an der Zellatmung beteiligten Enzyme Bestandteile der (inneren) Mitochondrienmembran sind. Diese Membranen erscheinen auf Grund ihres Gehalts an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (62) besonders empfindlich gegenüber einem peroxidativen Angriff. Eine durch Cd stimulierte Lipidperoxidation könnte deshalb -wie auch zuvor für die Gesamtzelle angenommen (Kapitel 4.5.3.)- mit strukturellen und funktionellen Änderungen isolierter Mitochondrien einhergehen. Ein Zeichen zunehmender Membranpermeabilität sind das Anschwellen der Organellen und der Verlust ihrer Rekontraktionsfähigkeit (111). Diese strukturellen Änderungen sind auf Lipidperoxidation verschiedenster Genese zurückgeführt worden (63-65, 111). Auch die Metalle Zink und Quecksilber führen zur Mitochondrien-Schwellung (111) und bewirken Lipidperoxidation in Hepatocyten (Tab.9; 41-43). Das Cd-bedingte Schwellen ist bislang noch nicht untersucht worden. Ebensowenig ist bekannt, ob Cd auch in isolierten Mitochondrien LPO stimuliert und ob dies -gegebenenfalls- mit Cd-abhängigen Strukturänderungen ursächlich verbunden ist.

Ziel dieser Untersuchung ist daher, die Bedeutung der Lipidperoxidation in der Cd-bedingten Mitochondrien-Strukturänderung zu klären.

In stärkerem Maße als Hg^{2+} (23,58,115) und Zn^{2+} (58) kann Cd in geringen Konzentrationen die Atmung von Mitochondrien entkoppeln (23,58,59) und in höheren Konzentrationen, wie jeder Entkoppler, hemmen (58, siehe auch 27,29,110). Diese bereits in Tab.7 dargestellte Beeinträchtigung der Mitochondrien in der Zelle soll auch an Mitochondrien untersucht werden mit dem Ziel, die zur Atmungsdepression wirksame Cd-Konzentration zu finden.

Strukturänderungen der isolierten Organellen können als Trübungsextinktion der verdünnten Mitochondrien-Suspension (0.1-0.3 mg Protein ml) bei 520-540 nm photometrisch verfolgt werden. Die Abnahme der Extinktion ist gleichbedeutend mit der Zunahme des Schwellens (64,65,96,111).

Abb. 25 zeigt, daß Cd ein zeit- und konzentrationsabhängiges Anschwellen der Mitochondrien bewirkt. 1.25 und 2.5 µM Cd -also Konzentrationen, die etwa in dieser Höhe auch in der Mitochondrien-Fraktion der mit Cd inkubierten Hepatocyten gefunden werden (Kapitel 4.5.1, Abb.16)- lösen bereits diese Reaktion aus (Abb.25). Das Ausmaß des Schwellens ist hierbei linear mit dem Logarithmus der Cd-Konzentration korreliert (Bereich 1.25-10 µM Cd; 10 min; R = 0.938). Das Schwellen ist (zumindest teilweise) umkehrbar. 0.21 mM ATP wirken der Cd-bedingten Schwellung entgegen, erkennbar an der Zunahme der im Cd-Inkubat verminderten Trübungsextinktion (Abb.26). Der Mechanismus der ATP-induzierten Rekontraktion ist noch unbekannt (96,111). Die Fähigkeit der Organellen,zum Teil ihre ursprüngliche Gestalt in Gegenwart von ATP wiedereinzunehmen, schwindet mit der Inkubationsdauer in Gegenwart des schwellenden Agens Cd (Abb.26). Nach 35 min Inkubation ist, selbst nach mehrmaliger Gabe von ATP (nicht dargestellt) das Schwellen nicht mehr reversibel.

Das dem Cd im Ionenradius ähnliche Calzium (Ca^{2+}) und der Cd-Antagonist Zn^{2+} bewirken ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme des Schwellens (Abb.27). Die Schwellamplitude ist jedoch im Vergleich zur Reaktion auf Cd (Abb.25) geringer (bezogen auf die eingesetzte Ionen-Konzentration). Auch hier findet sich eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Konzentration und der Schwellamplitude nach 10 min Inkubation (Ca^{2+}: R = 0.983; Zn^{2+}: R = 0.964; nicht dargestellt). Die Wirkung der Metalle wird durch den Hemmer des Ca-Transports Ruthenium Rot (s. Kapitel 4.5.3, Tab. 8) in unterschiedlichem Maße beeinflußt (Abb.28): die Ca-Antwort wird vollkommen und die Cd-Antwort teilweise aufgehoben; das Zn-bedingte Schwellen wird jedoch nicht gemindert.

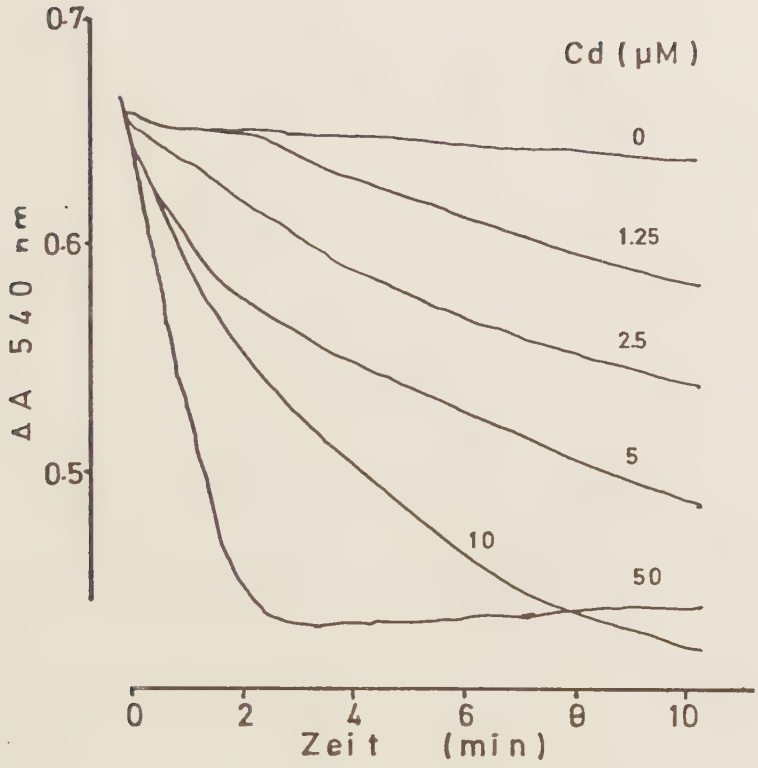


Abb.25: Cd-bedingtes Schwellen isolierter Lebermitochondrien gehungerter Ratten

Isolierte Mitochondrien wurden 1+20 mit O_2-gesättigter 0.175 M KCl/25 mM Tris-Lösung (pH 7.4) verdünnt (Endkonz. 0.25 mg Protein/ml). Die Messung erfolgte in einer Halbmikro-Küvette bei 37°C. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufzeichnung des Schwellens (Abnahme der Absorption bei 540 nm) von 3 ähnlichen Experimenten nach Zugabe der angezeigten Cd-Konzentrationen.

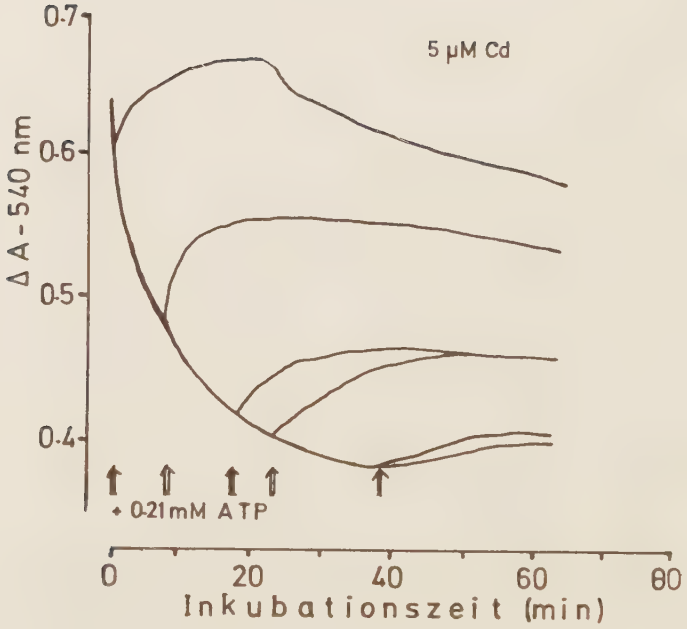


Abb.26: Einfluß von Cd auf die Rekontraktionsfähigkeit isolierter Mitochondrien

Mitochondrien wurden wie in Abb.25 inkubiert. Zu den angezeigten Inkubationszeiten (pfeil) wurden 0.21 mM ATP (Endkonz.) hinzugegeben. Die Suspension wurde fakultativ mit Carbogen begast.

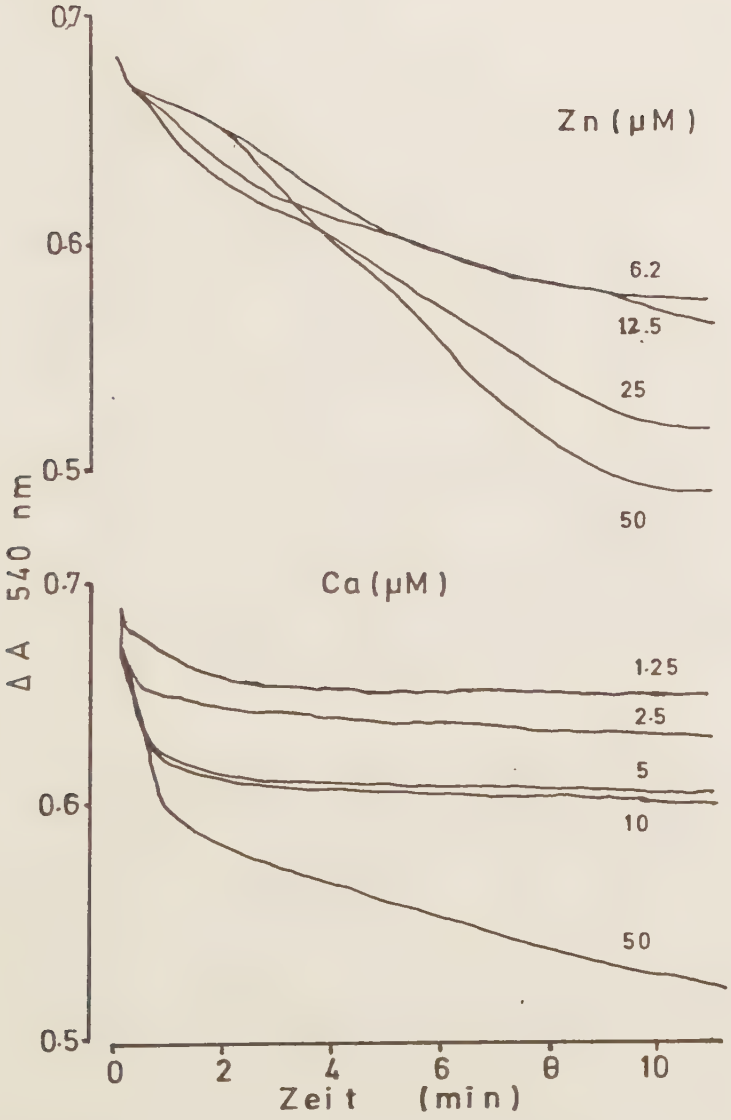


Abb.27: Schwellen isolierter Mitochondrien in Gegenwart von Zn und Ca

Mitochondrien wurden wie in Abb.25 inkubiert nach Zugabe der angegebenen Endkonzentrationen von Zn und Ca

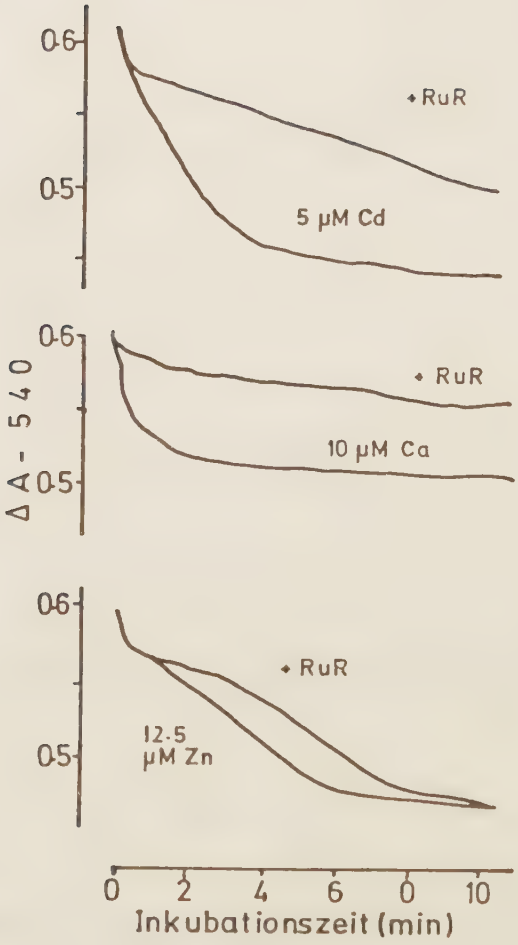


Abb.28: Einfluß von Ruthenium Rot auf das Schwellverhalten isolierter Mitochondrien

Mitochondrien wurden wie in Abb.25 inkubiert. Ruthenium Rot (RuR, 2 µM Endkonz.) wurde zu Inkubationsbeginn hinzugegeben und das Schwellen durch Zugabe von Cd, Ca und Zn in den angegebenen Endkonzentrationen induziert.

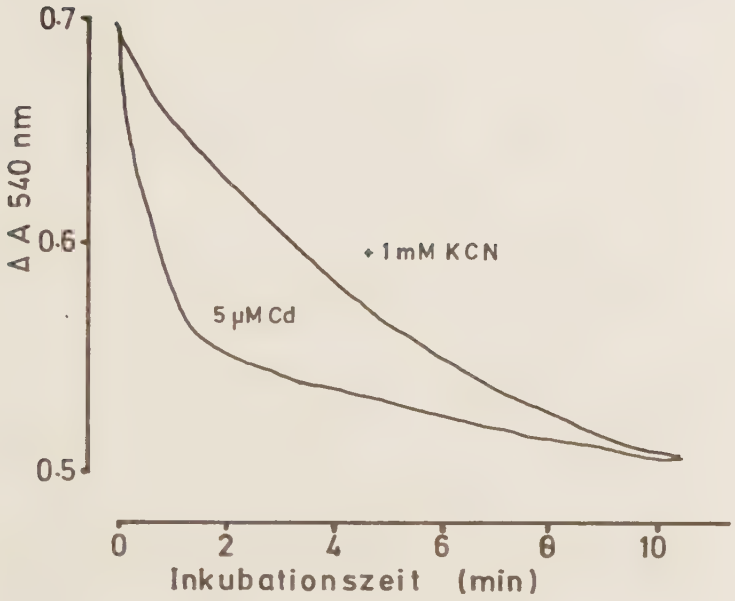


Abb.29: Einfluß von KCN auf das Schwellen der Mitochondrien

Mitochondrien wurden wie in Abb.25 inkubiert. Cd und Cd+KCN wurden zu Inkubationsbeginn in den angegebenen Endkonzentrationen hinzugegeben.

Dieses Ergebnis belegt, daß das Cd-bedingte Anschwellen der Mitochondrien zum Teil über Ca^{2+}-Bindungsstellen an den Membranen bestimmt wird. Möglicherweise ist hierin ein zum Ca^{2+} alternativer energieabhängiger Cd-Transport in die Mitochondrien eingeschlossen (7,61); 1 mM KCN führen zu einer ausgeprägten Verzögerung des initialen Anschwellens durch Cd, ohne jedoch das Ausmaß des Schwellens zu vermindern (Abb.29). Dies weist auf eine frühe energieabhängige Phase der Cd-Wirkung hin.

Auch von anderen Autoren ist ein Cd-Ca-Antagonismus an der Mitochondrienmembran festgestellt worden (60,61). Dieser soll sowohl den Ca-Transport über die Membran (61) als auch die bei geringen Cd-Konzentrationen beobachtete Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung betreffen (60). Offensichtlich geht die Ca-abhängige Wirkung von Cd auf das Schwellen zu späteren Inkubationszeiten über in ein Schwellen, das auf einer generellen Permeabilisierung der Membran beruht (Abbildungen 25,26.28). Die Irreversibilität dieses Schwellens, erkennbar am Verlust der Rekontraktionsfähigkeit (Abb. 26), ist Ausdruck einer tiefgreifenden Schädigung der Membran. Dies mag Folge einer zunehmend unspezifischen Bindung des Schwermetalls (7,59) an andere die Permeabilität begrenzende Strukturen (u.a. SH-Gruppen von Membranproteinen) sein.

Zn^{2+}, das dem Cd ähnliche, jedoch essentielle Metall, entfaltet seine Wirkung offensichtlich nicht (initial) über Ca-Bindungsstellen der Membran (Abb.27). Eine Interaktion von Cd mit Zn^{2+} im Schwellverhalten der Mitochondrien ist nicht beobachtet worden (nicht dargestellt). Es ist anzunehmen, daß Zn auch an essentielle Gruppen der Membran bindet (112,113) und u.a. hierdurch zur vermehrten Permeabilisierung mit der Folge des Anschwellens führt.

Das Anschwellen der Mitochondrien ist bereits (wenn auch in geringem Ausmaß) in den Kontroll-Ansätzen zu beobachten (Abb.25). Dieses sogenannte spontane Schwellen ist Ausdruck der Alterung der Organellen im Inkubationsablauf, ein Prozeß, der u.a auf die Aktivierung des in der Membran lokalisierten Enzyms Phospholipase A_2 zurückgehen soll (64,114). Die Aktivierung wird durch Detergenzien verstärkt und soll dann zu einem vermehrten Anschwellen führen (64).

Cd kann auch direkt mit Membranbestandteilen (d.h. Phospholipiden, Histidyl- und Cysteinyl-Gruppen von Proteinen) reagieren (Abb.1) (23-26). Es soll hierbei schon in Konzentrationen um 10 nM expandierend wirken (24). Dies legt die Annahme nahe, daß das Cd-abhängige Schwellen über die Änderung der Beschaffenheit der Mitochondrienmembran, ähnlich wie für Detergenzien beschrieben (64), durch Aktivierung der Phospholipase A_2 hervorgerufen wird. Da hierdurch ungesättigte Fettsäuren aus der Membran freigesetzt würden (114), die der Peroxidation unterliegen können (Einleitung, Abb.2), wäre ein Zusammenhang -möglicherweise ursächlicher Art (63-65)- zwischen Cd-abhängiger LPO und Cd-abhängigem Schwellen denkbar.

Abb.30 zeigt im Vergleich zu Resultaten aus Hepatocyten-Suspensionen, daß Cd -wie erwartet- LPO auch in Mitochondrien-Suspensionen stimuliert. Ebenso wie in Hepatocyten erfolgt dies zeit- und konzentrationsabhängig (nicht dargestellt). In beiden Suspensionen wird -wie oben angenommen- LPO durch vermehrtes Permeabilisieren der Membran in Gegenwart des Detergenz Desoxycholsäure (DOC) erhöht. Nupercain dagegen, ein Hemmer der Phospholipase A_2 (114), vermindert in beiden Suspensionen wirkungsvoll die Cd-bedingte LPO.
Das Schwellen der Mitochondrien wird jedoch weder durch die antioxidativ wirksamen Substanzen (+)-Cyanidanol-3 und Paracetamol (siehe Abb.15, Tab.9) noch durch Nupercain vermindert (Abb.31). Ebensowenig führt der Abbau von Lipidperoxiden (durch GSH-Peroxidase, siehe Kapitel 4.5.2), die Entfernung radikalischen Sauerstoffs ($\dot{O}_2^-$; durch Superoxid-Dismutase) noch die Katalase-bedingte Metabolisierung von H_2O_2 zu einer Änderung des Cd-Effekts (Abb.31).

Die Befunde zeigen, daß das Cd-bedingte Schwellen vermutlich nicht -entgegen der obigen Annahme- auf einer Phospholipase-Aktivierung beruht,und daß das Enzym möglicherweise zur Stimulation der Cd-bedingten LPO beiträgt. Den Befunden in Abb.31 zufolge ist die Cd-bedingte LPO bzw. die sie begleitende Bildung von Lipidradikalen und radikalischen Sauerstoffspezies -umgekehrt- vermutlich nicht Ursache des Anschwellens der Mitochondrien, wie es für andere Stimulantien angenommen wird (63-65,111). So läßt das starke initiale Anschwellen der Mitochondrien in Gegenwart von Cd (Abb.25)

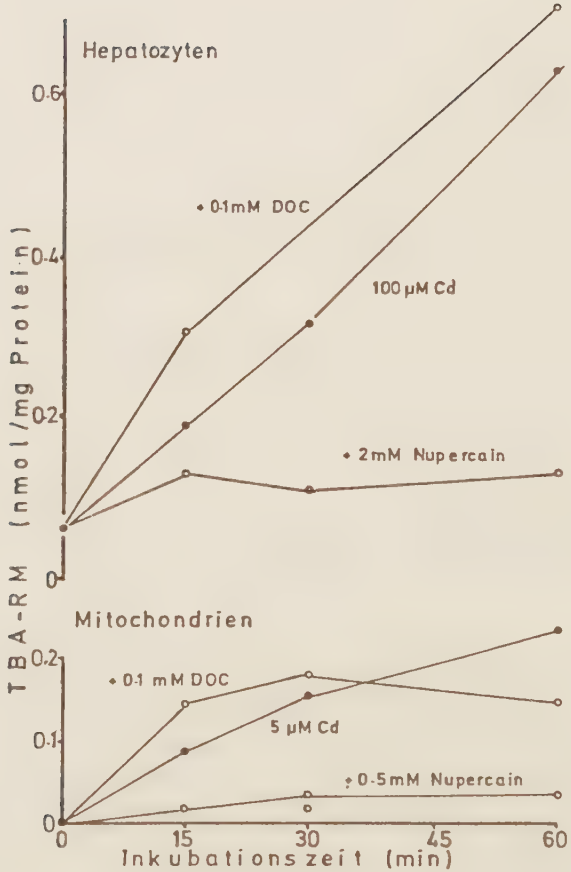


Abb.30: Vergleich der Bildung TBA-reaktiven Materials in Cd-behandelten Hepatocyten und Mitochondrien

Hepatocyten (7.8 mg Protein/ml) und Mitochondrien (3.7 mg Protein/ml) wurden in Gegenwart der angezeigten Cd-Konzentrationen bei 37°C unter Luft inkubiert. Desoxycholsäure (DOC) und Nupercain wurden in den angegebenen Endkonzentrationen zu Inkubationsbeginn eingesetzt.

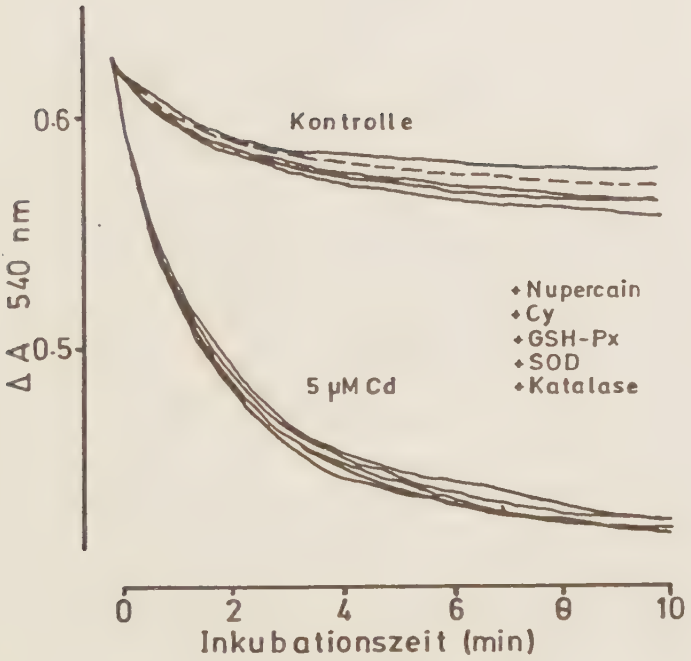


Abb.31: Cd-abhängiges Schwellen in Gegenwart von Hemmern der Lipidperoxidation

Mitochondrien wurden wie in Abb.25 inkubiert. Zu Inkubationsbeginn wurden 0.5 mM Nupercain, 50 µM (+)-Cyanidanol-3 (Cy), 50 mU Glutathion-Peroxidase (GSH-Px), 1 U Superoxid-Dismutase (SOD) und 5 U Katalase hinzugegeben (Endkonz. bzw. -aktivitäten). Cd wurde anschließend zugesetzt.

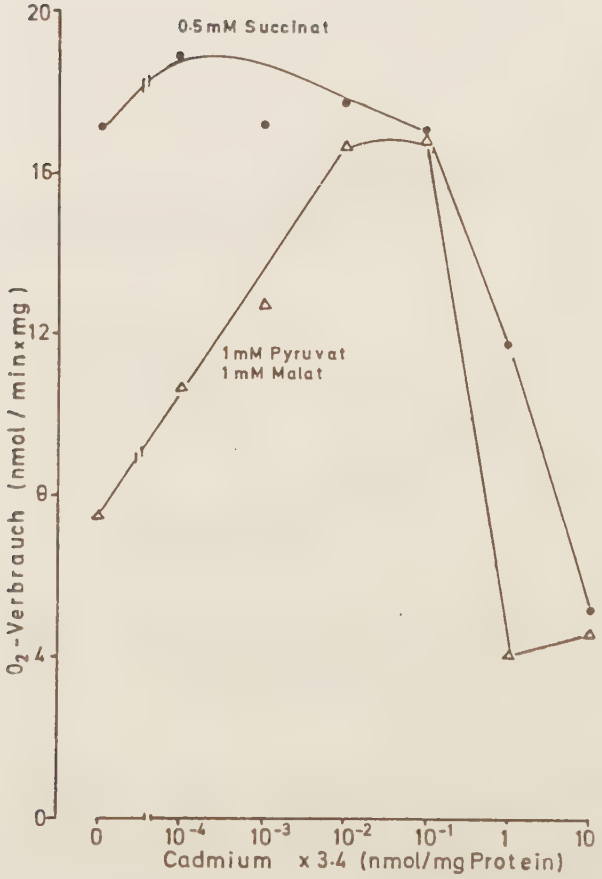


Abb.32: Einfluß von Cd auf die Substrat-Veratmung isolierter Mitochondrien

Mitochondrien wurden in einem auf 37°C temperierten Reaktionsgemisch folgender Zusammensetzung auf 0.4 mg Protein/ml verdünnt: 111 mM KCl, 7.4 mM $MgCl_2$, 2.6 mM KH_2PO_4 und 18 mM Glycyl-Glycin-Puffer, pH 7.4. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit einer Clark-Elektrode während 3 min Inkubation bestimmt. Cd und die Substrate wurden in den angegebenen Endkonzentrationen eingesetzt. Die Succinat-Atmung wurde nach 2 min Vorinkubation der Mitochondrien mit 1.3 mM Amytal gemessen.

keine zur Bildung von Lipidperoxiden erforderliche Lag-Phase bis zur Ausübung der Membranwirkung erkennen. Es ist eher wahrscheinlich, daß Cd durch Besetzen essentieller Membrangruppen die Permeabilität der Mitochondrienmembran zunächst für kleine Ionen erhöht (7) und hierdurch das Schwellen herbeiführt.

Folge oder Begleiterscheinung der Schädigung der strukturellen Integrität kann die Beeinträchtigung der Atmungskette durch Cd sein (27,58). In Abb. 32 ist die Abhängigkeit der Veratmung Flavin (Succinat)- und Nukleotid (Pyruvat + Malat)-gebundener Substrate von der Cd-Konzentration dargestellt. Die Atmung wird bis etwa 0.03 nmol Cd/mg Protein stimuliert und -nach einer Hemmung der weiteren Stimulation im Bereich von 0.03 bis 0.3 nmol Cd/mg Protein- durch höhere Konzentrationen blockiert. Während die Zunahme der Atmung substrat-abhängig erscheint (Abb.32), weist die Abnahme des weiteren O_2-Verbrauchs bis unter den Kontrollwert auf eine unspezifische Lähmung der Atmungskette hin, die möglicherweise auf einer generellen Hemmung des Substrat-Umsatzes beruht (7,27,58).

Diese Befunde zeigen, daß Cd in starkem Maße die Substrat-Veratmung in isolierten Mitochondrien beeinflußt. Ebenso wie von anderen Autoren berichtet (58), geht die Stimulation des O_2-Verbrauchs (die wahrscheinlich die Entkopplung der Mitochondrien durch Cd repräsentiert (23,58,59)) bei einer Konzentration zwischen 0.3 und 3.0 nmol Cd/mg mitochondriales Protein über in eine Hemmung des O_2-Verbrauchs (58) . In Übereinstimmung mit Untersuchungen an Makrophagen (27) beträgt die zur gleichartigen Störung (d.h. der Atmungshemmung) in Mitochondrien und Hepatocyten führenden wirksamen Cd-Konzentration an den isolierten Organellen etwa ein Zehntel der Cd-Konzentration im Zell-Inkubat. Der kritische Konzentrationsbereich wird -wie die Kompartimentierungsversuche zeigen (Kapitel 4.5.1, Abb.16)- innerhalb von 30 min Inkubation der Hepatocyten mit 25 µM Cd (ca. 3 nmol Cd/mg Zellprotein) in den Mitochondrien erreicht. Bei höheren Konzentrationen im Inkubat (in der Regel 50 µM Cd, entsprechend 6-7 nmol Cd/mg Zellprotein) (Abbildungen 12,13, 15,21-23, Tabellen 7-9) mag dieser Wert schon frühzeitig überschritten werden (Vgl. folgendes Kapitel, Tab.10). Hieraus wird insbe-

sondere die Hemmung der Entkoppler-stimulierten Atmung bei 25 µM Cd und die Beeinträchtigung des endogenen O_2-Verbrauchs bei 50 µM Cd in Hepatocyten erklärbar (Kapitel 4.5.3.).

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß Cd sowohl die Struktur (gemessen als Zunahme des Schwellens und Abnahme der Rekontraktionsfähigkeit) als auch die Funktion isolierter Mitochondrien (Substrat-Veratmung) in Abhängigkeit von der Konzentration schädigt. Obwohl keine klare zeitliche Trennung zwischen beiden Wirkungen auf Grund der zum größten Teil unspezifischen Reaktion auf Cd erkennbar ist, kann doch angenommen werden, daß die Störung der strukturellen Integrität der Mitochondrienmembran zumindest zur Beeinträchtigung der Funktion (d.h. der Atmung) beitragen kann. Lipidperoxidation erscheint hierbei nicht als Ursache, sondern eher als Folge einer Kette von Cd-Wirkungen, die in einer nicht mehr reversiblen Membranpermeabilisierung gipfeln.

4.5.5 Interaktion von Cadmium mit essentiellen Metallen in isolierten Hepatocyten; Einfluß auf die Cadmium-bedingte Lipidperoxidation

Die Toxizität von Cd muß im Zusammenhang gesehen werden mit seiner Beziehung zu den für die Zelle essentiellen Metallen. Wie in Kapitel 4.5.3 und 4.5.4 gezeigt worden ist, führt Zn^{2+} zu ähnlichen Wirkungen auf den Energie-Status, die Lipidperoxidation und das Schwellverhalten von Mitochondrien wie Cd. Auch Ca^{2+} kann mit Cd interagieren (Abb.28). Zn und Ca, aber auch Mn sind als essentielle Metalle bekannt, die einigen Aspekten der Cd-Toxizität entgegenwirken (7,23,43,59,67,112). Diese Eigenschaft wird von einigen Autoren auf ihre die Membranstruktur erhaltende Wirkung zurückgeführt (7, 23,61,66).

Im folgenden soll untersucht werden, ob auch in der isolierten Zelle die akute Cd-Giftigkeit und die Cd-bedingte Lipidperoxidation durch Zn, Ca und Mn geändert werden kann, mit dem Ziel, weiteren Einblick in die Rolle der Cd-LPO im Spektrum der Cd-Wirkungen zu erhalten.

Tabelle 10 zeigt, daß die durch Cd vermehrte TB-Anfärbbarkeit durch Zn, Ca und Mn um bis zu 40% vermindert wird. Dieser Antagonismus ist nicht zwangsläufig verbunden mit der Hemmung der Cd-Aufnahme in die Zellen: Ca und Mn führen zu keiner Änderung der Aufnahme; Zn bewirkt dagegen eine Hemmung der Aufnahme um ca. 50% (bereits bei 50 µM Zn, nicht dargestellt). Dies ist vermutlich auf die Interaktion von Zn mit Cd am gleichen Carrier in der Zellmembran zurückzuführen (s. Kapitel 4.1; (19,67,68)). Eine derartige Wechselwirkung ist für Ca und Mn nicht gegeben (7).

Die Hemmung der Zellmembranschädigung ist offenbar auch nicht mit der Abnahme des Zell-ATP verknüpft (Abb.10). Zn bewirkt ein weiteres Absinken des ATP (s. Kapitel 4.5.3). Dies weist auf eine gleichsinnige Hemmung der Energiebereitstellung im Mitochondrion hin (60,113). Ca führt zu keiner Verbesserung des erniedrigten ATP-Bestands, möglicherweise auf Grund seiner ebenfalls entkoppelnden Wirkung (59) und der Ca-Cd-Interaktion am Mitochondrion (s. Kapitel 4.5.4; (60, 61)). Mn hingegen, das die Cd-bedingte Entkopplung unterbindet (23,59; s.w.u.), führt zu einer Erhöhung des durch Cd gesenkten ATP-Gehalts der Hepatocyten.

Die Cd-Aufnahme in der Mitochondrien-Fraktion wird durch Zn, Ca und Mn nicht geändert (Tab.10). Eine der Cd-Zn-Interaktion an intakten Hepatocyten entsprechende Aufnahmehemmung ist also in der Mitochondrien-Fraktion nicht gegeben. Unter Zn-Einfluß scheint sich die Affinität der Mitochondrien zu Cd zu erhöhen, oder es muß die in der Zelle verfügbare "freie" Cd-Konzentration durch Zn erhöht werden -da der Gesamtgehalt der Hepatocyten an Cd abnimmt. Cd wird wahrscheinlich in hohem Ausmaß unspezifisch am/im Mitochondrion gebunden (s. Kapitel 4.5.4). Es interagiert mit Ca und Mn vermutlich nur an wenigen sensiblen Stellen des Mitochondrions (7,59), so daß eine Funktionsänderung der Organellen nicht auch in einer gleich starken Änderung der Cd-Aufnahme zum Ausdruck kommt.

Die Cd-abhängige LPO wird durch Zn, Ca und Mn unterschiedlich beeinflußt (Abb.33). Zn, das selbst LPO induziert (Kapitel 4.5.3), verstärkt in niedrigen Konzentrationen die Cd-induzierte LPO bis zu einem Maximalwert; höhere Konzentrationen haben dann einen zunehmend geringeren Effekt. Ca und in besonderem Maße Mn hemmen dagegen konzentrationsabhängig sowohl die spontane Lipidperoxidation (nicht dargestellt) als auch die Cd-induzierte LPO.
Diese Befunde entsprechen den Wechselwirkungen an Mitochondrien (s. Kapitel 4.5.4). Die Mn-bedingte Hemmung der Cd-LPO, die auch in Hepatocyten gefütterter Ratten beobachtet wurde (43), erfolgt vermutlich nicht über einen Eingriff in enzymatische Vorgänge. Mn hemmt nämlich auch die an Hitze-inaktiviertem Material beobachtbare Lipidperoxidation durch Ascorbinsäure (nicht dargestellt; (65)). Möglicherweise hemmt Mn durch seine Redoxeigenschaft schon die Initiation der LPO (S. Einleitung, Abb.2).

Im Zusammenhang mit der offensichtlich membranschützenden Wirkung von Zn, Ca und Mn, bekräftigt die ungleichsinnige Änderung der Cd-stimulierten LPO durch diese Metall-Ionen, die Annahme, daß die Cd-LPO nicht in einem direkten Zusammenhang mit der durch Cd hervorgerufenen Zellschädigung steht (Kapitel 4.3 und 4.4; (18,42,43). Eine Schutzwirkung von Zn ist trotz seiner membranstabilisierenden (66) und der die Cd-Aufnahme hemmenden Eigenschaft (Tab.10; 67,68) hinsichtlich des Energie-Bestands und der LPO nicht gegeben (Tabellen 9 und 10; Abb.33). Wahrscheinlich wirken Cd und Zn an ähnlichen

Behandlung	Cd-Aufnahme in Hepatocyten (% Angebot) 30 min	Cd-Konzentration in Mitochondrien (nmol/mg) 30 min	(%)	ATP $\frac{nmol}{mg}$ 30 min	TB-Anfärbbarkeit (%) 60 min
50 µM Cd	46.9 ± 4.8	3.96 ± 3.3	100	9.5	64.8 ± 10.7
+ 100 µM Zn	27.6 ± 12.0	3.41 ± 0.2	86.1	6.5	48.5 ± 6.7
+ 5 mM Ca	49.7 ± 7.6	3.54 ± 0.6	89.3	8.0	35.0 ± 4.5
+ 500 µM Mn	49.3 ± 2.5	3.79 ± 0.1	95.7	16.5	25.7 ± 1.0

Tab.10: Einfluß von essentiellen Metallen auf Cd-abhängige Parameter

Hepatocyten gehungerter Ratten wurden mit den angegebenen Metallen versorgt und mit 50 µM Cd während 30 oder 60 min inkubiert. Die Aufnahme von Cd-109 (57.4 nCi/ml) durch die Hepatocyten und in die Mitochondrien wurde durch Zentrifugal-Filtration (Kapitel 3.5.4) bzw. Differentialzentrifugation (Kapitel 3.11) nach Kapitel 3.13 bestimmt. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus 3-8 Präparationen.

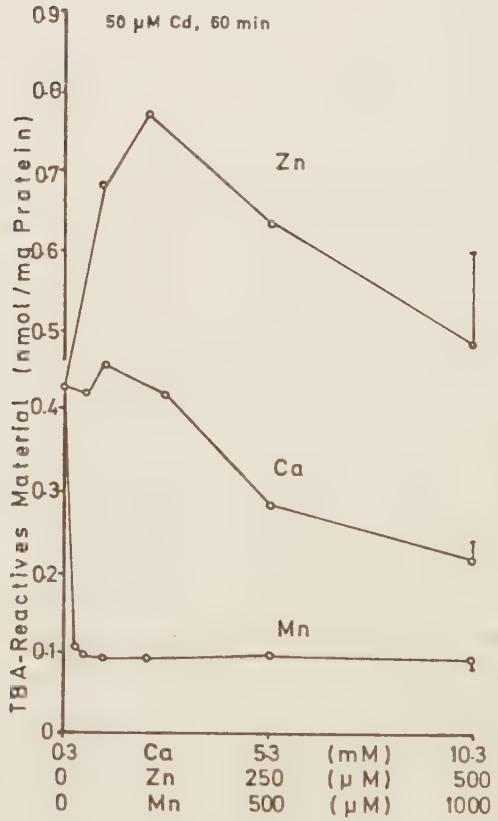


Abb.33: Einfluß von essentiellen Metallen auf die Bildung TBA-reaktiven Materials in Gegenwart von Cd

Hepatocyten wurden mit Zn, Ca und Mn in den angegebenen Konzentrationen versorgt und 60 min in Gegenwart von 50 µM Cd inkubiert. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± Sx aus mindestens 3 Präparationen.

intrazellulären Strukturen (s. Kapitel 4.5.4) und führen zu einer gleichsinnigen Schädigung, deren Folge -nicht jedoch Ursache- u.a. die Lipidperoxidation ist. Zn ist somit nicht stets Antagonist von Cd, sondern es hat durchaus synergistische Effekte von toxikologischer Relevanz.

Die hier dargestellten Befunde haben gezeigt, daß die Ausbildung der Cd-bedingten Zellschädigung und die LPO-Stimulation durch essentielle Metalle bzw. deren Ionen moduliert werden kann. Wesentlich zur Ausprägung der Cd-Giftigkeit erscheint die Konzentration von Cd an sensiblen Membran-und/oder Enzymgruppen, die auch durch Zn, Ca und Mn belegt werden können. Die Höhe der Cd-Konzentration in der Zelle ist vermutlich -insbesondere in Anwesenheit extrazellulär verabreichter essentieller Metalle- von zweitrangiger Bedeutung.

5. Abschließende Betrachtung

Aus den Befunden und Ergebnissen läßt sich ein im Vergleich zur Abb.1 (Einleitung) deutlich klareres Bild der akuten Giftigkeit von Cd auf Hepatocyten und ihrer Beziehung zur Cd-stimulierten Lipidperoxidation zeichnen (Abb.34). Ein einfacher Schädigungsmechanismus kann auf Grund der Vielfalt der zellulären Wirkungen von Cd nicht angegeben werden. Im Ablauf der Untersuchungen haben sich 3 Wirkungsweisen von Cd als wesentlich für die Verminderung der strukturellen und funktionellen Intaktheit der Zelle herausgeschält: 1. die Cd-bedingte Schädigung von SH-Enzymen, 2. die Cd-bedingte Beeinträchtigung der Atmungskette,und 3. die mit ihr wahrscheinlich wechselseitig verbundene Störung der Integrität vor allem intrazellulärer Membranen.

Ausgehend von der ausgeprägten Cd-Anreicherung in Hepatocyten (Kapitel 4.1 und 4.3) ist zunächst die Zellmembran als primärer Ort der Schädigung angenommen worden (Kapitel 4.2). Zwar führt der Hungerzustand zu einer stärkeren Membranpermeabilisierung (Kapitel 4.3); die in Hepatocyten beobachtete Abnahme des GSH-Gehalts wie auch die Stimulation der Lipidperoxidation durch Cd in Leberzellen gehungerter Ratten (Kapitel 4.3, 4.4 und 4.5.2) kann jedoch nicht auf die Zellmembranschädigung durch Cd zurückgeführt werden (Kapitel 4.4). Der unter Cd-Einfluß frühzeitig absinkende GSH-Gehalt und die Stimulation der LPO, sowie die Cd-Akkumulation im Cytosol und besonders in den Mitochondrien (Kapitel 4.5.1) lassen auf primär intrazelluläre Angriffsorte schließen.

So werden die SH-Enzyme des Glutathion-Peroxidase-Systems (Glutathion-Reduktase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) durch Cd in Hungertier-Hepatocyten in ihrer Funktion beeinträchtigt (Kapitel 4.5.2). Diese Schädigung ist vermutlich verantwortlich für die nur in dieser Zellpopulation, nicht in Hepatocyten gefütterter Ratten , gefundene Cd-abhängige Abnahme des GSH-Gehalts (Kapitel 4.3).

Die durch Cd in Hepatocyten stimulierte LPO (Kapitel 4.3) hat zu der nicht zutreffenden Annahme geführt, daß seine toxische Wirkung über die Peroxidation von Lipiden der Zellmembran erfolgt. Die Zellmembranschädigung wird jedoch nicht durch die Cd-bedingte LPO bzw.

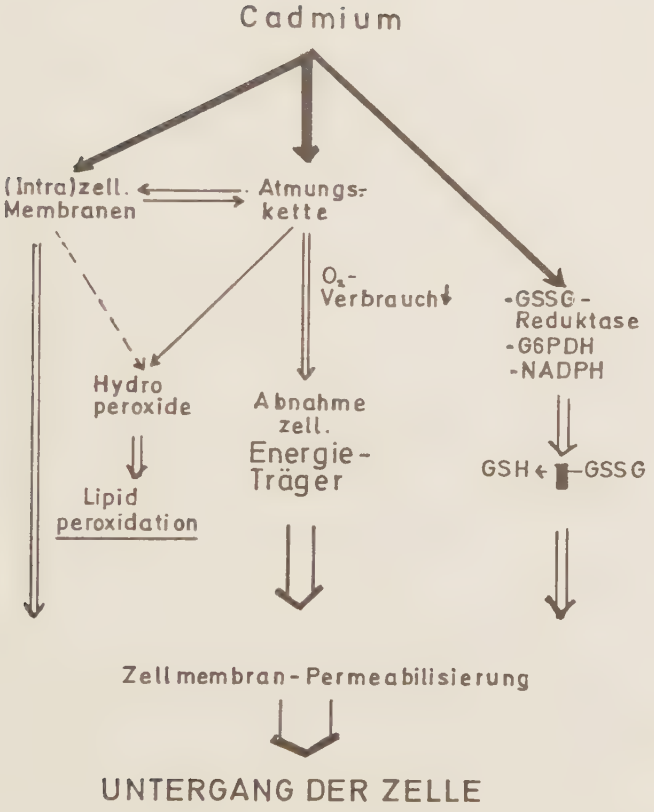


Abb.34: Cd-Giftigkeit und Lipidperoxidation in isolierten Hepatocyten gehungerter Ratten

deren Zerfallsprodukten hervorgerufen (Kapitel 4.4). Ebensowenig führt eine durch Zn vermehrte LPO zu einer verstärkten Membranpermeabilität (Kapitel 4.5.5) Die Lipidperoxidation ist auch nicht Mittler der Cd-bedingten Hemmung von SH-Enzymen, noch kann sie auf eine Verminderung des Lipidperoxidabbaus über eine direkt oder metabolisch gehemmte Glutathion-Peroxidase zurückgeführt werden (Kapitel 4.5.2). Auch diese neue Hypothese steht im Einklang mit der Beobachtung, daß die LPO nicht notwendigerweise mit einer Verminderung des zellulären GSH-Gehalts einhergeht (Kapitel 4.4). Hieraus kann jedoch nicht abgeleitet werden, daß die Cd-stimulierte LPO keine Bedeutung für die zelluläre akute Cd-Giftigkeit besitzt.

Die vermutlich primäre und hauptsächliche, weil besonders früh und bereits in Gegenwart nanomolarer Cd-Konzentrationen erkennbare Schädigung der Zelle ist im/am Mitochondrion lokalisiert. Die Substratveratmung wird blockiert (Kapitel 4.5.4), die Entkoppler-stimulierte Zellatmung vermindert und der endogene Sauerstoffverbrauch der Zellen eingeschränkt (Kapitel 4.5.3). Hiermit einher geht die Abnahme energiereicher Verbindungen (ATP) (Kapitel 4.5.5), die Erniedrigung des ATP-ADP-Quotienten und der Adenylat Energie Ladung sowie die vermehrte Bildung von Lactat mit der Folge der Erhöhung des Lactat-Pyruvat-Quotienten (Kapitel 4.5.3).

Die in Hepatocyten gefundene enge Korrelation zwischen ATP-ADP-Quotienten und der Cd-bedingten LPO sowie die auch durch Hemmer der Mitochondrienfunktion herbeigeführte LPO-Erhöhung (Kapitel 4.5.3) legen die Annahme nahe, daß die LPO durch die Funktionsstörung der Mitochondrien ausgelöst wird. Für einen solchen Zusammenhang sprechen auch die Wirkungen von Zn (Kapitel 4.5.3 und 4.5.5) und Mn (Kapitel 4.5.5) auf den durch Cd erniedrigten ATP-Bestand und die Stimulation der LPO.

Strukturelle Basis dieser Störung könnte die Schädigung der Mitochondrienmembran sein. So reagieren die Organellen mit verstärktem Anschwellen als Folge der zunehmenden bis zur Irreversibilität gehenden Permeabilisierung ihrer Membranen schon bei niedrigen Cd-Konzentrationen (Kapitel 4.5.4). Weder die Erniedrigung des Energiestatus (ATP/ADP; Adenylat Energie Ladung) noch das Schwellen der Mitochondrien ist auf die Lipidperoxidation zurückzuführen (Kapitel 4.5.3.

und 4.5.4.).
Die in Hepatocyten beobachtete Cd-LPO ist eher eine Folge dieser Cd-Wirkungen. Hierfür spricht, daß auch in Mitochondrien -deren Membranen im Gegensatz zur Zellmembran einen hohen Grad ungesättigter Fettsäuren aufweisen (62)- die LPO durch Cd stimuliert wird (Kapitel 4.5.4.). Da Cd sich in den Mitochondrien stark anreichert, wird LPO bereits bei niedrigen extrazellulären Cd-Konzentrationen stimuliert (Kapitel 4.1.und 4.5.4.). Es ist denkbar, daß die in den Organellen stimulierte LPO einen wesentlichen Beitrag zur Cd-stimulierten LPO in Hepatocyten liefert.

Wichtig zur Stimulation der LPO dürfte die Cd-bedingte Hemmung der Atmungskette sein (Kapitel 4.5.3 und 4.5.4). Peroxide können in Mitochondrien nach Reduktion der Atmungskette durch Elektronentransporthemmer entstehen (64,107). Eine Atmungshemmung ist bereits in Gegenwart der eingesetzten Entkoppler-Konzentration, und insbesondere in Anwesenheit von Atractylosid zu erwarten (Kapitel 4.5.3, Tab.8; (78)). Die Zunahme der LPO durch diese Hemmer der Mitochondrienfunktion und durch Cd läßt vermuten, daß die Stimulation der LPO im Ablauf der Hemmung der Atmungskette erfolgt. Für einen solchen ursächlichen Zusammenhang sprechen auch die Interaktionen von essentiellen Metallen mit der Cd-abhängigen LPO (Kapitel 4.5.5.). So erhöht Ca die Zellatmung (76) und vermindert Mn die Cd-bedingte Funktionsstörung der Mitochondrien (23,59), während Zn selbst die Atmung beeinträchtigt (58); gleichermaßen wird die Cd-abhängige LPO durch Ca und Mn vermindert und durch Zn verstärkt (Kapitel 4.5.5).

Meine Untersuchungen zeigen, daß akute Belastung von Hepatocyten gehungerter Ratten mit Cd tiefgreifende Beeinträchtigungen der Struktur und Funktion der Zellen bewirkt. Die auffälligste strukturelle Schädigung der Zelle, die Permeabilisierung der Zellmembran, stellt wahrscheinlich das letzte Glied in der Kette Cd-bedingter Störungen dar. Geschädigt werden zuvor SH-Enzyme und mitochondriale Strukturen und Funktionen. Folge ist die Abnahme des GSH-Gehaltes, die Permeabilisierung intrazellulärer Membranen und die Verminderung der Energie-Bereitstellung der Zelle. Keine

dieser Cd-Wirkungen ist vermutlich allein verantwortlich für den Untergang der Zelle in Gegenwart von Cd. Erst die Kombination der Metall-bedingten Schädigungen -die auch den membranexpandierenden Effekt von Cd einbezieht- führt zum Zelltod. Lipidperoxidation scheint in keinem Fall verantwortlich für die Ausprägung der Cd-Giftigkeit zu sein. Die LPO stellt jedoch ein sicheres Indiz für intrazelluläre Schädigungen durch Cd dar und kann daher -im negativen Sinn- als funktioneller Parameter der in Gegenwart von Cd eingeschränkten Lebensfähigkeit der Zelle dienen.

6. Zusammenfassung

Cadmium stimuliert zeit- und konzentrationsabhängig Lipidperoxidation in Hepatocyten 18 h gehungerter Ratten. Es führt zur Abnahme des zellulären GSH-Gehalts und zur Zunahme der Zellmembranpermeabilität. Verglichen mit Hepatocyten gefütterter Ratten ist die Reaktion der Hungertier-Hepatocyten auf Cd hinsichtlich der letztgenannten Parameter stärker ausgeprägt. Diese erhöhte Empfindlichkeit unter Hungerbedingungen wird jedoch nicht über die Cd-stimulierte LPO vermittelt: Weder die GSH-Abnahme noch die Zunahme der Zellmembranschädigung ist auf lipidperoxidative Prozesse zurückzuführen.

Bevor die Zellmembran geschädigt wird, bewirkt Cd eine tiefgreifende Störung intrazellulärer, insbesondere im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisierter Prozesse, die in der GSH-Abnahme und der Stimulation der LPO zum Ausdruck kommt.

So schädigt Cd SH-Gruppen-haltige Enzyme des Glutathion-Peroxidase-Systems: Die metall-bedingte Hemmung der Glutathion-Reduktase- und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität ist mit der GSH-Abnahme verknüpft und vermutlich dessen Ursache.

Die Lipidperoxidation ist nicht Mittler der Cd-bedingten Enzymschädigung. Sie ist auch nicht Folge eines verminderten Lipidperoxidabbaus, da die Glutathion-Peroxidase nicht durch Cd inaktiviert wird.

Cd führt insbesondere zu einer Schädigung der Atmung sowohl in der Zelle als auch in isolierten Mitochondrien; die Veratmung Flavin- und Nukleotid-gebundenen Substrats wird -ab einer kritischen Cd-Konzentration- beeinträchtigt, die ATP-Bildung vermindert, die ATP-ADP-Quotienten und die Adenylat Energie Ladung herabgesetzt, der zelluläre Sauerstoffverbrauch erniedrigt und Lactat gebildet.

Die Stimulation der Lipidperoxidation durch Cd korreliert mit der Verminderung des zellulären ATP-ADP-Quotienten. Auch Inhibitoren der Atmungskette führen per se zu einer LPO-Stimulation, die in Gegenwart von Cd verstärkt wird. Die Cd-bedingte LPO selbst ist jedoch nicht Ursache der Abnahme energiereicher Verbindungen in der Zelle.

Cd führt bereits in geringen Konzentrationen zum Anschwellen isolierter Mitochondrien bis hin zur irreversiblen Membranpermeabilisierung. Die initiale Phase des Schwellens ist an Ca-Bindungsstellen der Membran geknüpft. Cd stimuliert auch in Mitochondrien LPO. Sie ist jedoch nicht Ursache des Schwellens, sondern eher eine Folge des verstärkten Integritätsverlustes der Membran.

Es wird angenommen, daß die Hemmung der Atmungskette durch Cd zur Stimulation der Lipidperoxidation beiträgt. Für diese Annahme spricht auch die Reaktion der Hepatocyten auf Cd in Gegenwart von Zn, Ca und Mn. Zn vermindert ebenso wie Cd den Energie-Status der Zelle und vermehrt die LPO; die schützende Wirkung dieses Metalls gegenüber Cd-bedingten Zellschäden zielt -unter der Bedingung akuter Cd-Belastung- den Untersuchungen zufolge nur auf die Integrität der Zellmembran, nicht auf mitochondriale Ereignisse oder LPO. Ca und, in verstärktem Maße, Mn vermindern die in den Zellen durch Cd stimulierte LPO.

Der Zelluntergang wird vermutlich durch die Kombination von Schädigungen der Zellmembran, von SH-Enzymen und besonders der Mitochondrien herbeigeführt, die direkt durch Cd ausgelöst werden. Die Lipidperoxidation kann als Bei- oder Folgeprodukt der Einwirkung von Cd auf mitochondriale Prozesse verstanden werden. Die Stimulation der LPO durch Cd erscheint daher als sicheres und frühes Indiz akuter Cd-bedingter intrazellulärer Schädigung von Hepatocyten und kann als (reziproker) Parameter für die funktionelle Integrität der Zellen in der Cd-Giftigkeit dienen.

7. Literaturverzeichnis

(1) Babich,H. und Stotzky,G.: Effects of Cadmium on the Biota: Influence of Environmental Factors (1978) Adv.Appl.Microbiol. 23, 55-117

(2) Stokinger,H.E.: Cadmium. In: Patty´s Industrial Hygiene and Toxicology, Vol.IIA (Clayton,G.D. und Clayton,F.E. Hrsg.), J.Wiley and sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1981, pp 1563-1580

(3) Lauwerys,R.R.: Environment and quality of life. The toxicology of cadmium. Commission of the European Communities, Brüssel, Luxemburg, 1982

(4) Canton,J.H. und Sloof,W.: Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd^{2+}) with fresh water organisms of different trophic levels. (1982) Ecotoxicol.Environ.Safety 6, 113-128

(5) Diehl,J.F.: Die Belastung des Verbrauchers durch Cadmium- eine kritische Übersicht. Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe 3/1981

(6) Nordberg,G.F.: Factors influencing Metabolism and Toxicity of Metals: A Consensus Report. (1978) Environ.Health Perspect. 25, 3-41

(7) Webb,M.: Interactions of cadmium with cellular components. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (Webb,M. Hrsg.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1979, pp 285-340

(8) Samarawickrama,G.P.: Biological effects of cadmium in mammals. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium (Webb,M. Hrsg.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1979, pp 341-422

(9) Decker,C.F., Byerum,R.J. und Hoppert,C.A.: A study of the distribution and retention of Cadmium-115 in the albino rat (1957) Arch.Biochem.Biophys. 66, 140-145

(10) Hoffman,E.O., Cook,J.A., Di Luzio,N.R. und Coover,J.A.: The effects of acute Cadmium administration in the liver and kidney of the rat. (1975) Lab.Invest. 2, 655-664

(11) Faeder,E.J., Chaney,S.Q., King,L.C., Hinners,T.A., Bruce,R. und Fowler,B.A.: Biochemical and Ultrastructural Changes in Livers of Cadmium-Treated Rats. (1977) Toxicol.Appl.Pharmacol. 39, 473-487

(12) Cook,J.A., Marconi,E.A. und Di Luzio,N.R.: Lead, Cadmium, Endotoxin Interaction: Effect on Mortality and Hepatic Function. (1974) Toxicol.Appl.Pharmacol. 28, 292-302

(13) Cain,K. und Skilleter,D.N.: Selective Uptake of Cadmium by the Parenchymal Cells of Liver. (1980) Biochem.J. 188, 285-288

(14) Ammitzboll,T., Kobayasi,T., Grundt,L. und Clausen,J.: Toxicology of Triethyllead, Methylmercury and Cadmium Determined in Chick Embryo Brain Cultures. (1978) Arch.Toxixol. Suppl. 1, 319-322

(15) Olsen,I. und Jonsen,J.: Effect of Cadmium Acetate, Copper Sulphate and Nickel Chloride on Organ Cultures of Mouse Trachea. (1979) Acta Pharmacol.Toxicol. 44, 120-127

(16) Solaiman,D., Bratanow,N., Dolhun,P., Saryan,L.A., Schwarzbauer,J., Wielgus,S. und Petering,D.H.: Early Reactions of Cadmium with Ehrlich Cells. (1979) J.Inorg.Biochem. 10, 125-133

(17) Rudd,C.J. und Herschman,H.R.: Metallothionein Accumulation in Response to Cadmium in a Clonal Rat liver Cell Line. (1978) Toxicol.Appl.Pharmacol. 44, 511-521

(18) Stacey,N.H., Cantilena,L.R.Jr und Klaassen,C.D.: Cadmium Toxicity and Lipid Peroxidation in Isolated Rat Hepatocytes. (1980) Toxicol.Appl.Pharmacol. 53, 470-480

(19) Corrigan,A.J. und Huang,P.C.: Cellular Uptake of Cadmium and Zinc. (1981) Biol.Trace Element Research 3, 197-216

(20) Baur,H., Kasperek,S. und Pfaff,E.: Criteria of Viability of Isolated Liver Cells. (1975) Hoppe-Seyler´s Z.Physiol. Chem. 356, 827-838

(21) Dickson,A.J. und Pogson,Ch.I.: The Metabolic Integrity Of Hepatocytes In Sustained Incubations. (1977) FEBS Lett. 83, 27-32

(22) Pfaff,E., Schuler,B., Krell,H. und Höke,H.: Viability Control and Special Properties of Isolated Rat Hepatocytes. (1980) Arch.Toxicol. 44, 3-21

(23) Vallee,B.L. und Ulmer,D.D.: Biochemical Effects Of Mercury, Cadmium And Lead. (1972) Annu.Rev.Biochem. 41, 91-128

(24) Suzuki,Y. und Matsushita,H.: Interaction Of Metal Ions And Phospholipid Monolayer As A Biological Membrane Model. (1968) Ind.Health 6, 128-133

(25) Kinter,W.B. und Pritchard,J.B.: Altered permeability of cell membranes. In: Reactions To Environmental Agents, Handbook of Physiology, Sect. 9 (Lee,D.H.K., Falk,H.L., Murphy,S.D. Geiger,S.R. Hrsg.) Williams and Wilkins, Baltimore pp 563-576

(26) Pritchard,J.B.: Toxic Substances and Cell Membrane Function. (1979) Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. 38, 2220-2225

(27) Cross,C.E., Ibrahim,A.B., Ahmed,M. und Mustafa,M.C.: Effect of Cadmium-Ion on Respiration and ATPase Activity of the Pulmonary Alveolar Macrophage: A Model for the Study of Environmental Interference with Pulmonary Cell Function. (1970) Environ.Res 3, 512-520

(28) Shukla,G.S. und Chondra,S.V.: Levels of Sulfhydryls and Sulfhydryl-Containing Enzymes in Brain, Liver and Testis of Manganese-Treated Rats. (1977) Arch. Toxicol. 37, 319-325

(29) Laborit,H., Baron,C., Ferran,C., Bonofacj,J.F., Topall,G. und Henriet,I.: Variations de la toxicité du cadmium en rapport avec les possibilités de contrôle des situations environnementales par l´activité motrice chez le rat. (1980) Agressologie 21,6 269-290

(30) Chung,A.E. und Langdon,R.G.: Human Erythrocyte Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase.II: Enzyme-Coenzyme Interrelationship. (1963) J.Biol.Chem. 238, 2317-2324

(31) Jocelyn,P.C.: Biochemistry of the SH-Group, Academic Press, London und New York, 1972

(32) Sies,H. und Wendel,A. (Hrsg.): Functions of Glutathione in Liver and Kidney. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978

(33) Slater,T.F.: Free Radical Metabolism in Tissue Injury, Pion Ltd., London, 1972

(34) Bus,J.S. und Gibson,J.E.: Lipid Peroxidation And Its Role In Toxicology. In: Reviews in Biochemical Toxicology. (Hodgson,E., Bernd,J. und Philpot,R.M. Hrsg.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York, Oxford, 1979, pp 125-149

(35) Gabor,S., Anica,Z. und Bordâs,E.: Cadmium-Induced Lipid Peroxidation in Kidney and Testes. Effect of Zinc and Copper. (1978) Rev.Roum.Biochim. 15/2, 113-117

(36) Högberg,J., Orrenius,S. und Larson,E.: Lipid Peroxidation in Isolated Hepatocytes. (1975) Eur.J.Biochem. 50, 595-602

(37) Anundi,I., Högberg,J. und Stead,A.H.: Glutathione Depletion in Isolated Hepatocytes: Its Relation to Lipid Peroxidation and Cell Damage. (1979) Acta Pharmacol.Toxicol. 45, 45-51

(38) Younes,M. und Siegers,C.P.: Lipid Peroxidation As A Consequence Of Glutathione Depletion In Rat And Mouse Liver. (1980) Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 27, 119-128

(39) Ekström,T. und Högberg,J.: Chloroform-Induced Glutathione Depletion And Toxicity In Freshly Isolated Hepatocytes. (1980) Biochem.Pharmacol. 29, 3059-3065

(40) Omaye,S.T. und Tappel,A.L: Effect Of Cadmium Chloride On The Rat Testicular Soluble Selenoenzyme, Glutathione Peroxidase. (1975) Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 12, 695-711

(41) Stacey,N.H. und Kappus,H.: Cellular Toxicity and Lipid Peroxidation in Response to Mercury. (1982) Toxicol.Appl.Pharmacol. 63, 29-35

(42) Stacey,N.H. und Klaassen,C.D.: Comparison Of The Effects Of Metals On Cellular Injury And Lipid Peroxidation In Isolated Rat Hepatocytes. (1981) J.Toxicol.Environ.Health 7, 139-147

(43) Stacey,N.H. und Klaassen,C.D.: Interaction Of Metal Ions With Cadmium-Induced Cellular Toxicity. (1981) J.Toxicol.Environ. Health 7, 149-158

(44) Köster-Albrecht,D., Kappus,H. und Remmer,H.: Lipid Peroxidation and Cell Damage in Isolated Hepatocytes due to Bromotrichloromethane. (1978) Toxicol.Appl.Pharmacol. 46, 499-505

(45) Eaton,D. und Klaassen,C.D.: Carrier-Mediated Transport Of Ouabain In Isolated Hepatocytes. (1978) J.Pharmacol.Exp.Ther. 205, 480-488

(46) Thor,H., Moldeus,P. und Orrenius,S.: Effect of Cysteine, N-Acetylcysteine and Methionine on Glutathione Biosynthesis and Brombenzene Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes. (1979) Arch.Biochem.Biophys. 192, 405-413

(47) Harris,R.N. und Anders,M.W.: Effect of Fasting, Diethyl Maleate, and Alcohols on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. (1980) Toxicol.Appl.Pharmacol. 56, 191-198

(48) Strubelt,O., Dost-Kempf,E., Siegers,C.P., Younes,M., Völpel,M., Preuss,U. und Dreckmann,J.G.: The Influence of Fasting on the Susceptibility of Mice to Hepatotoxic Injury. (1981) Toxicol. Appl.Pharmacol. 60, 66-77

(49) Davis,N. und Whipple,C.: The Influence of Fasting and Various Diets on the Liver Injury Effected by Chloroform anesthesia. (1919) Arch.Intern.Med. 23, 612-633

(50) Pessayre,D., Wandscheer,J.C.,Cobert,B., Level,R., Degott,C., Batt,A.M., Martin,N. und Benhamou,J.P.: Additive Effects of Inducers and Fasting on Acetaminophen Hepatotoxicity. (1980) Biochem.Pharmacol. 29, 2219-2223

(51) Vina,J., Hems,R. und Krebs,H.A.: Maintenance of Glutathione Contents in Isolated Hepatocytes. (1978) Biochem.J. 170, 627-630

(52) Balevska,P.S., Russanov,E.M. und Kassabova,T.A.: Studies on Lipid Peroxidation in Rat Liver by Copper Deficiency. (1981) Int.J.Biochem. 13, 489-493

(53) Splittgerber,A.G. und Tappel,A.L.: Inhibition of Glutathione Peroxidase by Cadmium and Other Metal Ions. (1979) Arch.Biochem.Biophys. 197, 534-542

(54) Black,R.S., Whanger,P.D. und Tripp,M.J.: Influence of Silver, Mercury, Lead, Cadmium and Selenium on Glutathione Peroxidase and Transferase Activities in Rats. (1979) Biol.Trace Element Research 1, 313-324

(55) Little,C. und O´Brien,P.J.: An Intracellular GSH-Peroxidase With A Lipid Peroxid Substrate. (1968) Biochem.Biophys. Res. Commun. 31, 145-324

(56) Sporn,A., Dinu,I. und Stoenescu,L.: Influence of Cadmium Administration on Carbohydrate and Cellular Energetic Metabolism in the Rat Liver. (1970) Rev.Roum.Biochim. 7/4, 299-305

(57) Sato,N., Kamada,T., Suematsu,T., Shichiri,M., Hayashi,N., Matsumara, T., Kishida,Y, Abe,H., Furuyama,F., Ishibashi,F. und Hagihara,B.: Cadmium Toxicity and Liver Mitochondria. I.Different Effects of Cadmium Administered In Vivo to Adult, Young and Ethionine-Fed Rats. (1978) J.Biochem. 84, 117-125

(58) Sato,N., Kamada,T., Suematsu,T., Abe,H., Furuyama,F. und Hagihara,B.: Cadmium Toxicity and Liver Mitochondria. II. Protective Effect of Hepatic Soluble Fraction against Cadmium-Induced Mitochondrial Dysfunction. (1978) J.Biochem. 84, 127-133

(59) Jacobs,E.E., Jacob,M., Sanadi,D.R. und Bradley,L.B.: Uncoupling Of Oxidative Phosphorylation By Cadmium Ion (1956) J.Biol.Chem. 223, 147-156

(60) Ogata,M., Hasegawa,T., Yamazaki,Y. und Nogami,Y.: Effect Of Cadmium On Changes In Concentration Of Adenine Nucleotides Induced By Mitochondria. (1978) Acta Med.Okayama 32, 387-392

(61) Jarvisalo,J.O., Kilpio,J. und Saris,N.E.: Toxicity of Cadmium to Renal Mitochondria When Administered in Vivo and in Vitro. (1980) Environ.Res. 22, 217-233

(62) Rouser,G.G., Nelson,J., Fleisher,S. und Dimon,G.: Lipid Composition of Animal Cell Membranes, Organelles and Organs. In: Biological Membranes (Chapman,D. Hrsg.), Academic Press, New York, 1968, 5

(63) Flohé,L. und Zimmermann,R.: GSH-Induced High-Amplitude Swelling of Mitochondria. In: Glutathion (Flohé,L., Benöhr,H.C., Sies,H., Waller,H.D. und Wendel,A. Hrsg.), G.Thieme-Verlag, Stuttgart, 1974, pp 245-260

(64) Vladimirov,Y.A., Olenev,V.I., Suslova,T.B. und Cheremisina, Z.P.: Lipid Peroxidation in Mitochondrial Membrane. (1980) Adv.Lipid Res. 17, 173-249

(65) Hunter,F.E.Jr, Scott,A., Hoffsten,P.E., Guerra,F., Weinstein, J., Schneider,A., Schutz,B., Fink,J., Ford,L. und Smith,E.: Studies on the Mechanism of Ascorbate-induced Swelling and Lysis of Isolated Liver Mitochondria. (1964) J.Biol.Chem.239, 604-613

(66) Chvapil,M.: New Aspects in the Biological Role of Zinc: A Stabilizer of Macromolecules and Biological Membranes. (1973) Life Sci. 13, 1041-1049

(67) Failla,M.L. und Cousins,R.J.: Zinc Uptake By Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. (1978) Biochim.Biophys.Acta 538, 435-444

(68) Stacey,N.H. und Klaassen,C.D.: Cadmium Uptake by Isolated Rat Hepatocytes. (1980) Toxicol.Appl.Pharmacol. 55, 448-455

(69) Berry,M.N. und Friend,D.S.: High-Yield Preparation Of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. A Biochemical and Fine Structural Study. (1969) J.Cell Biol. 43, 506-520

(70) Krebs,H.A., Cornell,N.W., Lund,P. und Hems,R.: Isolated Liver Cells as Experimental Material. In: Regulation of Hepatic Metabolism (Lundquist,F. und Tygstrup,N. Hrsg.) Munksgaard, Copenhagen, Academic Press, New York, 1974, pp 726-750

(71) Baur,H.: Isolierung und Charakterisierung von Leberparenchymzellen der Ratte. (1972) Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie, Universität Tübingen

(72) Hanks,J.H.: The Longevity of Chick Tissue Cultures Without Renewal of Medium. (1948) J.Cell Comp.Physiol. 31, 235-260

(73) Sies,H., Akerboom,P.M. und Tager,J.M.: Mitochondrial and Cytosolic NADPH Systems and Isocitrate Dehydrogenase Indicator Metabolites during Ureogenesis from Ammonia in Isolated Rat Hepatocytes. (1977) Eur.J.Biochem, 72, 301-307

(74) Soboll,S., Akerboom,T.P.M., Schwenke,W.D., Haase,R. und Sies, H.: Mitochondrial and cytosolic ATP/ADP ratios in isolated hepatocytes. A comparison of the digitonin method and the non-aqueous fractionation procedure. (1980) Biochem.J. 192, 951-954

(75) Cheng,S. und Levy,D.: The Interaction Of The Anionic Fluorescence Probe 1-Anilinonaphthalene-8-Sulfonate With Hepatocytes And Hepatoma Tissue Culture Cells. (1978) Biochim.Biophys. Acta 511, 419-429

(76) Jones,D.P. und Mason,H.S.: Gradients of O_2-Concentration in Hepatocytes. (1978) J.Biol.Chem. 253, 4874-4880

(77) Zuurendonk,P.F., Tischler,M.E., Akerboom,T.P.M., van der Meer, R., Williamson,J.R. und Tager,J.M.: Rapid Separation of Particulate and Soluble Fractions from Isolated Cell Preparations (Digitonin and Cell Cavitation Procedures). (1979) Methods Enzymol. 56, 207-223

(78) Van der Meer,R., Akerboom,P.M., Groen,A.K. und Tager,J.M.: Relationship between Oxygen Uptake of Perifused Rat Liver Cells and the Cytosolic Phosphorylation State Calculated from Indicator Metabolites and a Redetermined Equilibrium Constant. (1978) Eur.J.Biochem. 84, 421-428

(79) Bergmeyer,H.U. und Bernt,E.: UV-Test mit Pyruvat und NADH. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 607-612

Rozengurt,E. und Heppel,L.A.: A Specific Effect Of External ATP On The Permeability Of Transformed 3T3 Cells. (1975) Biochim.Biophys.Res.Commun. 67, 1581-1589

(81) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. und Randall,R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. (1951) J.Biol.Chem. 193, 265-275

(82) Bücher,T.: Über Ein Phosphatübertragendes Gärungsferment. (1947) Biochim.Biophys. Acta 1, 292-314

(83) Jaworek,D., Gruber,W. und Bergmeyer,H.U.: Adenosin 5'-diphosphat und Adenosin 5'-monophosphat. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 2178-2181

(84) Klingenberg,M.: Nicotin-adenin-dinukleotide (NAD,NADP,NADH, NADPH). Spektroskopische und fluorimetrische Verfahren. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 2094-2122

(85) Gutmann,I. und Wahlefeld,A.W.: L-(+)-Lactat. Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U.-Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 1510-1514

(86) Czok,R. und Lamprecht,W.: Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und D-Glycerat-2-phosphat. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974 pp 1491-1496

(87) Clark,L.C., Wolf,R., Granger,D. und Taylor,Z.: Continous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. (1953) J.Appl.Physiol. 6, 189-193

(88) Reiner,O., Athanassopoulos,S., Hellmer,K.H., Murray,R.E. und Uehleke,H.: Bildung von Chloroform aus Tetrachlorkohlenstoff in Lebermikrosomen, Lipidperoxidation und Zerstörung von Cytochrom P-450. (1972) Arch.Toxicol. 29, 219-233

(89) Beutler,E., Duran,O. und Mikus-Kelly,B.: Improved Method for the Determination of Blood Glutathione. (1963) J.Lab.Clin. Med. 61, 882-888

(90) Cohn,V.H. und Lyle,J.: A Fluorometric Assay for Glutathione. (1966) Anal.Biochem. 14, 434-440

(91) Günzler,W.A., Kremers,H. und Flohé,L.: An improved Coupled Test Procedure for Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9) in Blood. (1974) Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 444-448

(92) Mavis,R.D. und Stellwagen,E.: Purification and Subunit Structure of Glutathione Reductase from Baker's Yeast. (1968) J.Biol.Chem. 243, 809-814

(93) Löhr,W. und Waller,H.D.: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 599-606

(94) Bernt,E. und Bergmeyer,H.U.: Isocitrat Dehydrogenase. UV-Test. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer,H.U. Hrsg.) Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 587-590

(95) Rutter,W.J. und Lardy,H.A.: Purification and Properties of Pigeon Liver Malic Enzymes. (1958) J.Biol.Chem. 233, 374-382

(96) Lehninger,A.L.: Reversal of Thyroxine-induced Swelling of Rat Liver Mitochondria by Adenosine Triphosphate. (1959) J.Biol.Chem. 234, 2187-2195

(97) Seglen,P.O.: Preparation of Isolated Rat Liver Cells. (1976) Methods Cell Biol. 13, 29-83

(98) Colucci,A.V., Winge,D. und Krasno,J.: Cadmium Accumulation in Rat Liver. (1975) Arch.Environ.Health 30, 153-157

(99) Failla,M.L., Cousins,R.J. und Mascenik,M.J.: Cadmium Accumulation And Metabolism By Rat Liver Parenchymal Cells In Monolayer Culture. (1979) Biochim.Biophys.Acta 583, 63-72

(100) Hildago,H.A., Koppa,V. und Bryan,S.E.: Induction of Cadmium-Thionein in Isolated Rat Liver Cells. (1978) Biochem.J. 170, 219-225

(101) Chiarpotto,E., Olivero,J., Albano,E., Poli,G., Gravela,E. und Dianzani,M.U.: Studies on lipid peroxidation using whole liver cells: Influence of damaged cells on the pro-oxidant effect of ADP-Fe^{3+} and CCl_4. (1981) Experientia 37, 396-397

(102) Boyd,G.S.: Hormones and Cholesterol Metabolism. In: The Control of Lipid Metabolism (Grant,J.K. Hrsg.), Academic Press, London und New York, 1963, pp 79-97

(103) Groener,J.E.M., Klein,W. und Van Golde,L.M.G.: The Effect of Fasting and Refeeding on the Composition and Synthesis of Triacylglycerols, Phosphatidylcholines and Phosphatidylethanolamines in Rat Liver. (1979) Arch.Biochem.Biophys. 198, 287-295

(104) Siess,E.A., Brocks,D.G. und Wieland,O.H.: Subcellular Distribution Of Key Metabolites In Isolated Liver Cells From Fasted Rats. (1976) FEBS Lett. 69, 265-271

(105) Anundi,I., Högberg,J. und Stahl,A.: Involvement of Glutathione Reductase in Selenite Metabolism and Toxicity, Studied in Isolated Rat Hepatocytes. (1982) Arch.Toxicol. 50, 113-123

(106) Kappus,H., Kieczka,H., Scheulen,M. und Remmer,H.: Molecular Aspects of Catechol and Pyrogallol Inhibition of Liver Microsomal Lipid Peroxidation Stimulated by Ferrous Ion-ADP-Complexes or Carbon Tetrachloride. (1977) Naunyn-Schmiedeberg´s Arch.Pharmacol. 300, 179-187

(107) Nohl,H. und Jordan,W.: The Metabolic Fate of Mitochondrial Hydrogen Peroxide. (1980) Eur.J.Biochem. 111, 203-210

(108) Krebs,H.A. und Veech,R.L.: Pyridine Nucleotide Interrelations. In: The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Papa,S., Tager,J.M., Quagliariello,E. und Slater,E.C. Hrsg.) Adriatica Press, Bari, 1969, pp 329-382

(109) Atkinson,D.E. und Chapman,A.G.: The Adenylate Energy Charge in the Study of Enzymes in Vitro. (1979) Methods Enzymol. 55, 229-235

(110) Gonskii,Y.I.: Effect of Cadmium Chloride on Intensity of Tissue Respiration of Rat Liver and Brain Homogenates. (Original in Russisch) (1980) Ukr.Biokhim.Zh. 6, 706-710

(111) Lehninger,A.: Water Uptake and Extrusion by Mitochondria in Relation to Oxidative Phosphorylation. (1962) Physiol.Rev 42, 467-517

(112) Webb,M.: Protection by Zinc against Toxicity. (1972) Biochem.Pharmacol.,21, 2767-2771

(113) Webb,M.: Metabolic Targets of Metal Toxicity. In: Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals (Brown,S.S. Hrsg.) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1977, pp 51-64

(114) Scarpa,A. und Lindsay,J.G.: Maintenance of Energy-Linked Functions in Rat-Liver Mitochondria Aged in the Presence of Nupercain. (1972) Eur.J.Biochem. 27, 401-407

(115) Southard,J.H. und Nitisewojo,P.: Loss Of Oxidative Phosphorylation In Mitochondria Isolated From Kidneys Of Mercury Poisoned Rats. (1973) Biochem.Biophys.Res.Commun. 52, 921-927

(116) Högberg,J., Moldeus,P., Arborgh,B., O´Brien,P.J. und Orrenius, S.: The Consequences of Lipid Peroxidation in Isolated Hepatocytes. (1975) Eur.J.Biochem. 59, 457-462

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F.K. Ohnesorge für die Betreuung der Arbeit und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. M. Grieshaber danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Den Herren Dr. H. Dieter, Dr. H. Menzel, Dr. J. Abel und Dr. H. de Groot sowie Herrn Dipl.Biol. T. Noll danke ich für anregende Gespräche und für die Überlassung von Arbeitsgeräten.

Lebenslauf

Am 25. 8. 1952 wurde ich in Düsseldorf geboren. Dort besuchte ich von April 1959 bis April 1963 die Ev.Volksschule. Meine Weiterbildung erfolgte, wegen eines Wohnortwechsels meiner Eltern, an der Realschule Wesel, deren Besuch ich im Juni 1968 mit der Mittleren Reife abschloß. Ein erneuter Wohnortwechsel führte zum anschließenden Besuch des Städt.Aufbaugymnasiums am Bonneshof, Düsseldorf. Im Juni 1971 erhielt ich die Allg.Hochschulreife.

Von Juli 1971 bis Oktober 1972 leistete ich den Wehrdienst als Wehrpflichtiger in einem Sanitätsbataillon ab.

Im WS 1972/1973 nahm ich das Studium der Biologie, Chemie und Mathematik an der Päd.Hochschule Rheinland, Abtl. Neuss, auf. Im Oktober 1973 wechselte ich zum Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf über. Im September 1979 legte ich die Diplomprüfung in Biologie erfolgreich ab.

Seit November 1979 bin ich als Verw.Wiss.Ass. im Institut für Toxikologie der Universität Düsseldorf tätig. Anfang 1980 begann ich unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. F. K. Ohnesorge mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

Im November 1981 heiratete ich meine Frau Ira, geb. Schwerdtfeger.